

# **PRODUKSI GULA REDUKSI DARI BAGASSE TEBU MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN *CRUDE ENZYME* SELULASE DAN XILANASE**

**Nama Mahasiswa** : 1. Charlin Inova Sitasari  
NRP. 2310100076  
2. Yunus Imam Prasetyo  
NRP.2310100092  
**Jurusan** : Teknik Kimia, FTI- ITS  
**Dosen** : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

## **ABSTRAK**

Perkembangan dan kemajuan bidang pertanian di Indonesia telah menimbulkan peningkatan limbah pertanian yang sebagian besar merupakan limbah berlignoselulosa yang mengandung selulosa dan xilan. Limbah berlignoselulosa yang memiliki potensi sebagai bahan baku penghasil gula reduksi seperti glukosa dan xilosa antara lain bagasse tebu, sedangkan sebagian besar masyarakat di Indonesia masih menganggap bagasse tebu sebagai sampah dan pada akhirnya dibakar tanpa ada pemanfaatan yang optimal. Padahal Indonesia merupakan negara agraris yang menghasilkan bagasse tebu dalam jumlah besar setiap tahunnya. Produksi glukosa dan xilosa dari limbah pertanian berlignoselulosa dilakukan untuk mengoptimalkan limbah tersebut dalam rangka mengatasi permasalahan peningkatan penggunaan energi. Salah satu upaya adalah melalui proses degradasi enzimatik dan dilanjutkan proses fermentasi menjadi ethanol atau hidrogen. Tujuan dari penelitian ini adalah menghasilkan *crude enzyme* selulase dan xilanase dari *strain* jamur *T. reesei* dan *A. niger*, mempelajari pengaruh jenis dan komposisi campuran enzim pada hidrolisis enzimatik bagasse

tebu untuk mendapatkan gula reduksi yang optimum, dan mendapatkan perbandingan yield antara enzim murni dengan *crude enzyme* selulase dan xilanase dalam menghasilkan gula reduksi. Hasil *pretreatment* kimia *bagasse* tebu menggunakan NaOH 1% dengan suhu 80°C selama 16 jam adalah 63,60% selulosa; 20,78% hemiselulosa, dan 14,26% lignin. *Crude enzyme* dengan substrat jerami padi dari *T. reesei* memiliki aktivitas enzim selulase 0,285 U/ml dan xilanase 0,794 U/ml, sedangkan dari *A. niger* memiliki aktivitas enzim selulase 0,890 U/ml dan xilanase 3,481 U/ml. *Crude enzyme* dari *T. reesei* dengan substrat dedak gandum memiliki aktivitas enzim selulase 0,586 U/ml dan xilanase 8,715 U/ml. Hasil hidrolisis terbaik adalah dengan menggunakan enzim selulase murni yaitu didapatkan konsentrasi gula reduksi sebesar 3,566 g/L. Sedangkan hasil hidrolisis terbaik di antara penggunaan *crude enzyme* adalah dengan menggunakan *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase yaitu didapatkan konsentrasi gula reduksi 3,360 g/L. Yield gula reduksi yang paling besar adalah pada penggunaan *crude enzyme* selulase (2T:1A) yaitu didapatkan yield sebesar 0,163 gram gula reduksi/gram (selulosa+hemiselulosa) *bagasse* tebu.

**Kata kunci:** *Bagasse Tebu, Crude Enzyme, Enzim Komersial, Selulase, Xilanase, Hidrolisa, Trichoderma reesei dan Aspergilus niger*

# **PRODUCTION OF REDUCING SUGAR FROM SUGARCANE BAGASSE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCESS USING CELLULASE AND XYLANASE CRUDE ENZYME**

**Name** : 1. Charlin inova Sitasari  
NRP. 2310100076  
2. Yunus Imama Prasetyo  
NRP. 2310 100 092  
**Department** : Chemical Engineering, FTI-ITS  
**Advisor** : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

## **ABSTRACT**

The development and progress of agriculture in Indonesia has lead to increased agricultural waste which is largely a lignocellulosic waste containing cellulose and xylan. Lignocellulosic waste has potential as a raw material for produces reducing sugars such as glucose and xylose sugars which one from sugarcane bagasse, while most people in Indonesia is still regarded as waste and not used optimally. Whereas Indonesia is an agricultural country that produces large amounts of sugarcane bagasse each year. Production of glucose and xylose from agricultural ligocellulosic waste done to optimize the waste in order to overcome the problems increase in energy use. One effort is through the process of enzymatic hydrolysis and the continued to fermentation process into ethanol or hydrogen. The objective of this research are to produce cellulase and xylanase crude enzyme from *T. reesei* and *A. niger* strains, studied the effect of the variety and composition of the enzyme mixture on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse to obtain optimum reducing sugar, and make a comparison between the yield of purified enzyme with cellulase and xylanase crude enzyme in

production reducing sugars. The results of chemical pretreatment of sugarcane bagasse using 1% NaOH at a temperature of 80°C for 16 hours was 63.60% cellulose; 20.78% hemicellulose, and 14.26% lignin. Crude enzyme with substrate of rice straw from *T. reesei* have cellulase enzyme activity 0.285 U/ml and xylanase enzyme activity 0.794 U/ml, whereas from *A. niger* have cellulase enzyme activity 0.890 U/ml and xylanase enzyme activity 3,481 U/ml. Crude enzyme from *T. reesei* with wheat bran substrate have cellulase enzyme activity 0.586 U/ml and xylanase enzyme activity 8.715 U/ml. The best result of hydrolysis is using pure cellulase enzymes which obtained reducing sugar concentration of 3.566 g/l. While the best result of hydrolysis in using crude enzyme is by using with cellulase crude enzyme 2 (2T: 1A) / 1 xylanase and is obtained reducing sugar concentration of 3.360 g/l. The greatest sugar reduction yield is using cellulase crude enzyme (2T: 1A) which obtained a yield of 0.163 gram reducing sugar/gram (cellulose+hemicellulose) sugarcane bagasse.

***Keywords: Cellulase, Commercial Enzymes, Crude Enzyme, Sugarcane Bagasse, Hydrolysis, Trichoderma reesei and Aspergillus niger, Xylanase***

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1 Bagasse Tebu**

Ampas tebu adalah suatu residu dari proses penggilingan tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) setelah diekstrak atau dikeluarkan niranya pada Industri pemurnian gula sehingga diperoleh hasil samping sejumlah besar produk limbah berserat yang dikenal sebagai ampas tebu (*bagasse*). Ampas tebu merupakan limbah padat yang berasal dari perasan batang tebu untuk diambil niranya. Limbah ini banyak mengandung serat dan gabus. Ampas tebu selain dimanfaatkan sendiri oleh pabrik sebagai bahan bakar pemasakan nira, juga dimanfaatkan oleh pabrik kertas sebagai *pulp* campuran pembuat kertas. Kadangkala masyarakat sekitar pabrik memanfaatkan ampas tebu sebagai bahan bakar. Ampas tebu ini memiliki aroma yang segar dan mudah dikeringkan sehingga tidak menimbulkan bau busuk. Bagasse tebu mengandung 45% selulosa, 26% hemiselulosa (92% xylose), 20% lignin, 2,1% ash, dan komponen lain (garam) (Boussarsar, 2009).

Satu diantara energi alternatif yang relatif murah ditinjau aspek produksinya dan relatif ramah lingkungan adalah pengembangan hidrogen dari limbah-limbah pertanian (biomassa) yang mengandung banyak lignocellulose seperti bagasse (limbah padat industri gula). Indonesia memiliki potensi limbah biomassa yang sangat melimpah seperti bagasse. Industri gula khususnya di luar Jawa menghasilkan bagasse yang cukup melimpah. Potensi bagasse di Indonesia menurut Mulyadi (2009) cukup besar dengan komposisi rata-rata hasil samping industri gula di Indonesia terdiri dari limbah cair 52,9 persen, blotong 3,5 persen, ampas (bagasse) 32,0 persen, tetes 4,5 persen dan gula 7,05 persen serta abu 0,1 persen.

## II.2 Proses *Pretreatment* Bahan Berlignoselulosa

Proses degradasi enzimatik bahan berlignoselulosa yang berasal dari limbah pertanian dapat dipengaruhi oleh komposisi substrat limbah tersebut, kristalinitas selulosa dan ukuran partikel. Sehingga sangat diperlukan berbagai *pretreatment* agar diperoleh proses hidrolisis enzimatik yang optimal, seperti melakukan *pretreatment* mekanik dan *pretreatment* kimiawi. *Pretreatment* mekanik bahan baku diantaranya dengan *milling* dan *attrition* (Douglas dan George, 1988).

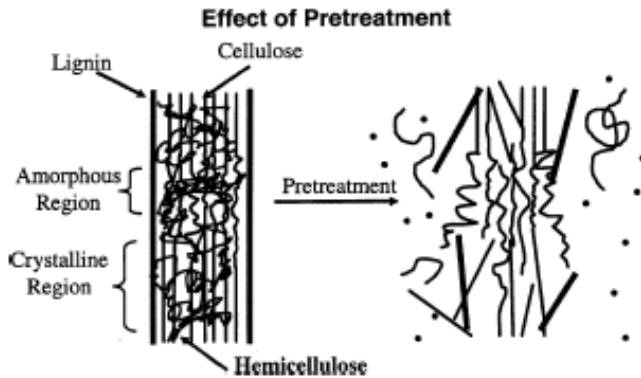
Selain *treatment* mekanik, *treatment* secara kimiawi pada bahan baku dilakukan dengan tujuan menghancurkan ikatan lignin sehingga komponen hemiselulosa ataupun selulosa lebih mudah untuk didegradasi. *Treatment* kimiawi bahan baku dapat dilakukan melalui beberapa *pretreatment* diantaranya adalah *Diluted acid pretreatment*, *Lime or alkaline pretreatment* dan *Ammonia pretreatment* (Mosier dkk, 2005). Adapun komponen-komponen pada bahan baku adalah sebagai berikut:

**Tabel II.1** Kandungan Lignin pada Berbagai Bahan

Bahan	Komposisi lignin (%)
Kulit kacang	30 – 40
Tongkol jagung	15
Jerami gandum	15 - 20
Jerami padi	5.5
<i>Bagasse</i> tebu	20

Sumber : (S. Prasad, dkk, 2007)

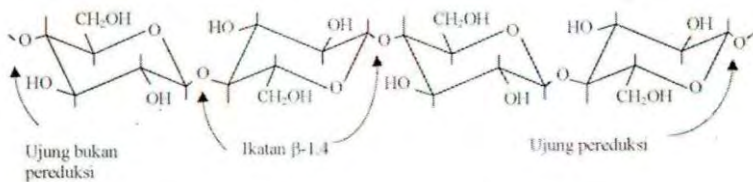
*Pretreatment* untuk menghilangkan komponen lignin pada bahan berlignoselulosa dapat digunakan suatu larutan NaOH encer sehingga komponen lignin rusak dan selanjutnya komponen selulosa maupun hemiselulosa menjadi lebih mudah didegradasi menghasilkan gula (Douglas dan George, 1988).



**Gambar II.1 Skema Proses *Pretreatment***

### II.3 Selulosa

Selulosa adalah bagian utama tanaman, berupa polimer glukosa linier hidrofilik yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Derajat polimerisasi untuk selulosa tumbuhan berada pada kisaran 305 sampai 15300 (Fengel dan Wergener, 1984). Polimer selulosa terdiri dari bagian kristalin dan amorf. Bagian amorf mudah dihidrolisis sedangkan bagian kristalin tidak mudah dihidrolisis baik secara kimiawi maupun enzimatik (Dahot dan Noomrio, 1996).



**Gambar II.2 Struktur Bangun Selulosa dan Ikatan  $\beta$ -1,4 serta Gugus Pereduksinya**

Hidrolisis selulosa terdiri dari dua tahap, yaitu degradasi selulosa menjadi selobiosa oleh endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4 glukanase kemudian dilanjutkan dengan pemecahan selobiosa oleh  $\beta$ -1,4 glukosidase. Kebanyakan sistem selulase

yang dihasilkan oleh jamur selulolitik, jumlah  $\beta$ -glukosidasenya kurang dari yang dibutuhkan untuk hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara efisien, sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa (Juhasz dkk., 2003; Martins dkk., 2008; Ahamed dan Vermette, 2008). Selobiosa merupakan inhibitor kuat terhadap endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanase mendegradasi selulosa. *Trichoderma reesei* mampu menghasilkan endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanase sampai 80% (Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006), tetapi  $\beta$ -glukosidasenya rendah (Martins dkk., 2008) sedangkan *Aspergillus niger* dapat menghasilkan  $\beta$ -glukosidase tinggi tetapi endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanasenya rendah.

#### II.4 Hemiselulosa (Poliosa)

Hemiselulosa adalah gabungan dari polimer-polimer dengan rantai relatif lebih pendek dan bercabang, yang terdiri dari monomer xylosa, arabinosa, glukosa, manosa dan galaktosa, dengan struktur amorf (Bailey dan Ollis, 1986). Selulosa berfungsi sebagai penguat pada batang tumbuhan, lignin berfungsi untuk melindungi selulosa dari aksi kimiawi maupun biologis sedangkan hemiselulosa pengikat selulosa dengan lignin (Lee, 1992). Meskipun dilindungi oleh lignin, jerami padi masih dapat dihidrolisis menjadi glukosa oleh mikroorganisma selulolitik seperti *Trichoderma reesei* (Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006) maupun *Aspergillus niger* (Aderemi dkk., 2008).

Secara struktural, hemiselulosa mempunyai sifat reaksi yang sama dengan selulosa tetapi komponen-komponen penyusun hemiselulosa berbeda dengan komponen-komponen penyusun selulosa. Beberapa karakteristik dari hemiselulosa yang membedakannya dari selulosa dapat di berikan antara lain :

- Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida, sedangkan selulosa merupakan homopolisakarida.
- Hemiselulosa relatif lebih mudah dihidrolisis oleh asam menjadi komponen-komponen monomernya yang terdiri dari D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa, D-xylosa, L-arabinosa, dan



sejumlah kecil L-ramnosa disamping menjadi asam D-galakturonat dan asam 4-O-metil-D-glukoronat.

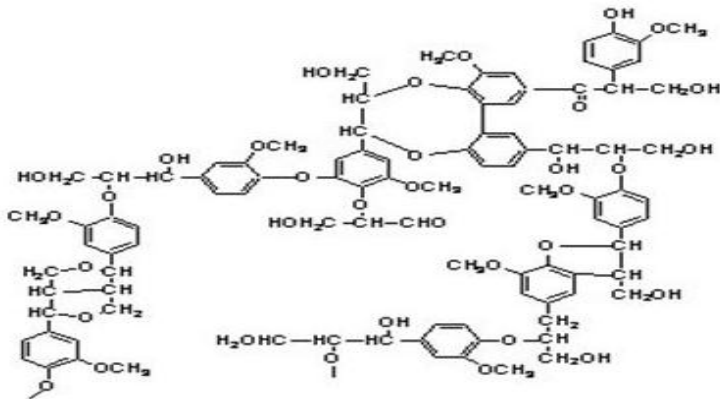
- Hemiselulosa mempunyai derajat polimerisasi hanya 200.
- Hemiselulosa akan mengalami reaksi oksidasi dan degradasi terlebih dahulu daripada selulosa, karena rantai molekul hemiselulosa lebih pendek dan bercabang.
- Hemiselulosa tidak larut dalam air tetapi larut dalam larutan alkali encer dan lebih mudah dihidrolisa oleh asam daripada selulosa.

## II.5 Lignin

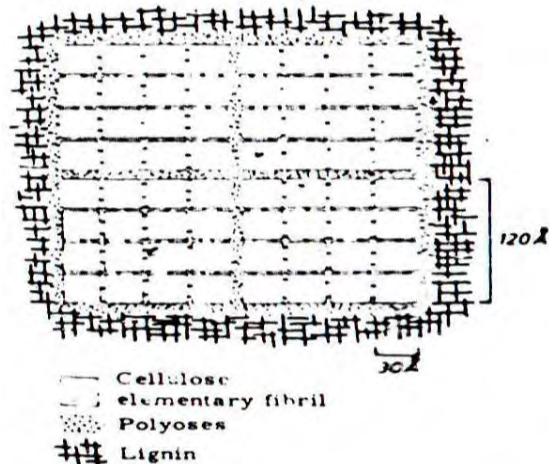
Lignin merupakan polimer penyusun kayu dengan kadar yang besar, tetapi berbeda dengan selulosa dan hemiselulosa, keduanya memiliki kemiripan struktur dimana keduanya termasuk dalam polisakarida, struktur molekul lignin sama sekali berbeda. Lignin merupakan salah satu polimer alami yang memiliki kompleksitas yang tinggi baik menyangkut struktur maupun heterogenitasnya. Beberapa informasi dari literatur menyangkut lignin dapat diberikan sebagai berikut:

- Lignin merupakan polimer amorf dengan berat molekul yang besar yang sulit untuk ditetapkan karena heterogenitas lignin yang sangat tinggi dan strukturnya kompleks.
- Kandungan lignin dalam kayu lunak lebih banyak bila dibandingkan dalam kayu keras.
- Selain perbedaan kadarnya, terdapat juga perbedaan struktur lignin dalam kayu lunak dan dalam kayu keras.
- Lignin terdiri dari senyawa aromatic yang tersusun atas unit fenilpropana. Sifat senyawa ini sangat stabil, sulit dipindahkan dan mempunyai bentuk yang bermacam-macam.
- Lignin diproduksi melalui reaksi lignifikasi dalam dinding sel tumbuhan yang vital untuk penyatuan struktur dari tumbuhan, untuk pertahanan terhadap pathogen dan serangan dari bahan kimia. Dalam tumbuh-tumbuhan lignin merupakan produk akhir metabolisme. Hal ini menunjukkan bahwa lignin merupakan senyawa yang sangat stabil.

- Dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa, lignin dipecah amat lambat oleh jamur dan bakteri (Schlegel dan Hans, 1994).
- Lignin bersifat hidrofobik. Adanya lignin mengakibatkan sifat kaku dan ketahanan tarik pada serat.
- Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan bahan oksidator lain.
- Lignin tahan terhadap proses hidrolisis oleh asam-asam mineral tetapi mudah larut dalam larutan sulfit dalam keadaan biasa.
- Pada umumnya hemiselulosa diperkirakan terikat dengan lignin meskipun ada juga kemungkinan terjadinya ikatan antara selulosa dengan lignin.



**Gambar II.3 Struktur Bangun Lignin**



**Gambar II.4 Keterkaitan Antara Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin**

## II.6 Enzim

Enzim adalah biokatalis yang diproduksi oleh jaringan makhluk hidup, yang berfungsi untuk mengkatalisa reaksi-reaksi yang terjadi dalam jaringan. Apabila tidak terdapat enzim maka reaksi-reaksi akan berjalan terlalu lambat untuk menopang kehidupan jaringan atau reaksi-reaksi tersebut akan memerlukan kondisi-kondisi non fisiologis (Montgomery dkk., 1999). Enzim mempunyai spesifikasi tinggi karena dapat bekerja dengan kecepatan perubahan besar dan pada keadaan fisiologis yang lunak, yaitu pada tekanan dan suhu rendah serta dalam larutan air.

Untuk menghasilkan enzim diperlukan bantuan mikroorganisme. Semua mikroorganisme memerlukan media yang mengandung sumber karbon untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme penghasil xilanase memerlukan xilan sebagai sumber karbon yang akan diaplikasikan dalam proses degradasi xilan menjadi xilosa. Untuk menghasilkan enzim xilanase dengan aktifitas tinggi perlu dilakukan pemilihan strain yaitu:

### 1. Seleksi *strain*

Dalam memproduksi enzim dari mikroorganisme, hal yang penting untuk dikerjakan adalah mulai menggunakan *strain* mikroorganisme yang paling aktif yang tersedia. Suatu program seleksi *strain* harus dilakukan dengan mengambil kultur dari alam atau koleksi kultur, dan melakukan pengujian-pengujian aktivitas enzim. Persyaratan utama dalam seleksi adalah kemudahan metodologi, sehingga pengujian yang cepat untuk sejumlah besar *strain* dapat dikerjakan.

### 2. Perbaikan kondisi pembentukan enzim

Bilamana sebuah *strain* mikroorganisme yang baik telah diperoleh, parameter-parameter harus diatur sampai titik optimal untuk memaksimalkan pertumbuhan dan produksi enzim. Diantara parameter yang penting adalah suhu, pH dan transfer oksigen. Hal penting lainnya adalah nutrisi untuk mikroorganisme, khususnya senyawa-senyawa yang mengandung karbon, nitrogen, fosfor, sulfur dan garam-garam mineral.

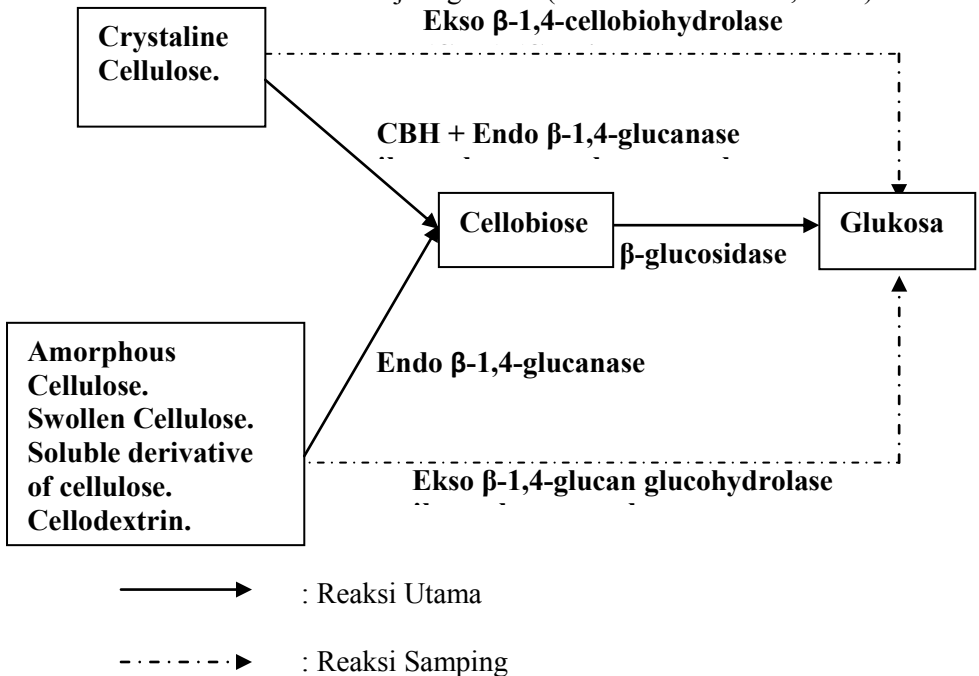
Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah dari golongan jamur dan bakteri. Adapun jenis jamur yang berpotensi menghasilkan enzim xilanase yaitu jamur *Trichoderma reesei*. *Trichoderma* adalah suatu jamur filamen yang secara luas berada di dalam tanah, tumbuh-tumbuhan yang membusuk, dan kayu. Walaupun biasanya dianggap sebagai suatu zat-pencemar, *Trichoderma* bisa menyebabkan infeksi/peradangan di dalam kehadiran faktor keterpengaruhannya tertentu. Merupakan jamur mesofilik yang tumbuh pada 25°C - 37°C, pH : 4-7 dan aerob (Ahamed, A. P. Vermette. 2008).

#### II.6.1 Enzim Selulase

Enzim selulase adalah enzim yang dapat mendegradasi selulosa (polisakarida dari bentukan glukosa). Selulase dapat menjadi katalisator reaksi pendegradasian selulosa. Umumnya selulase mendegradasi selulosa yang memiliki rantai yang lebih pendek dari komponen kayu (selulosa, hemiselulosa, lignin, ekstrakatif dan mineral). Rantai selulosa yang lebih pendek tersebut terdapat pada hemiselulosa (glukosa, galaktosa, manosa,

xylosa, arabinosa). Karena komponen hemiselulosa yang memiliki sifat seperti selulosa adalah glukosa maka hemiselulosa lebih dahulu terdegradasi dibandingkan dengan selulosa.

Selulase adalah campuran beberapa enzim yang komposisinya bervariasi, tergantung kepada mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi serta prosesnya. Tiga komponen yang telah teridentifikasi dalam selulase adalah endoglukanase ( $\text{endo-}\beta\text{-1,4-D-glukan-4 glukano hidrolase}$ , E.C.3.2.1.4) yang memecah ikatan  $\beta\text{-1,4-glukanohidrolase}$  pada rantai selulosa secara acak, eksoglukanase ( $\beta\text{-1,4-D-glukan selobiohidrolase}$ , E.C.3.2.1.91) yang memecah satuan selobiosa dari ujung rantai dan  $\beta\text{-glukosidase}$  (E.C.3.2.1.21) yang memecah selobiosa menjadi glukosa (Dahot dan Noomrio, 1996).



**Gambar II.5 Degradasi Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase**

Enzim selulase merupakan enzim yang menyerang ikatan glikosida dengan menghidrolisa selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase yang di produksi oleh mikroorganisme merupakan enzim yang di induksi dan hanya diproduksi jika mikroorganisme tumbuh pada substrat selulosa dan glukosa lain dengan ikatan  $\beta$ -1,4, seperti selobiosa. Tingginya aktifitas enzim selulase dilihat dari aktifitas selulase yang dihidrolisa ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida pada ujung-ujung non pereduksi rantai selulosa kristalin. Enzim selulase adalah enzim yang dibutuhkan untuk proses hidrolisa enzimatik pada selulosa. Enzim ini merupakan suatu campuran kompleks yang terdiri dari tiga enzim yaitu :

1. Endo- $\beta$ -1,4-glukanase

Endo- $\beta$ -1,4-glukanase adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 5.300-145.000. Enzim ini menyerang rantai bagian dalam dari selulosa amorphous menghasilkan selodextrin, sellobiosa, atau glukosa. Enzim ini tidak dapat menghidrolisa selulosa kristal secara sendirian, tetapi ketika bersamaan dengan Exo- $\beta$ -1,4-glukanase enzim ini dapat mendegradasi selulosa kristal secara intensif.

2. Exo- $\beta$ -1,4-glukanase

Exo- $\beta$ -1,4-glukanase adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 42.000-65.000. Ada dua jenis yaitu Exo- $\beta$ -1,4-cellobiohidrolase dan Exo- $\beta$ -1,4-glukan glukohidrolase. Enzim ini menyerang *Crystalline Cellulose*. Kerja enzim ini dihambat dengan adanya produk yaitu selobiosa atau glukosa.

3.  $\beta$ -1,4-glukosidase

$\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiosa adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 50.000-410.000. Enzim ini dapat menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa dan juga dapat mendegradasi seloligosakarida. Kerja enzim ini di hambat oleh produk reaksi yaitu glukosa.

Selulase dapat dihasilkan oleh berbagai macam mikroorganisme, baik bakteri maupun jamur, diantaranya *Cellulomonas biazotea* (Rajoka dkk., 1997), *T. reesei* (Bailey dan Tahtiharju, 2003; Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006;

Hao dkk., 2006; Ahamed dan Vermette, 2008), *T. viride* (Haq dkk., 2005), *A. niger* (Haq dkk., 2005; Ajayi dkk., 2007; Ahamed dan Vermette, 2008), *Melanocarpus albomyces* (Szijarto dkk., 2008), *Penicillium decumbens* (Jin dan Chen, 2006a), *Neurospora sithopila* (Dewi, 2002a, 2002b). Banyak mikro-organisme yang mampu mendegradasi selulosa, tetapi hanya sedikit yang dapat menghasilkan selulase dalam jumlah yang cukup untuk menghidrolisis seluruh selulosa kristalin (Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006).

### **Substrat untuk Produksi Enzim Selulase**

Selulase dapat diproduksi dari berbagai jenis karbohidrat, baik yang berupa bahan murni seperti laktosa (Sehnem dkk., 2006; Bailey dan Tahtiharju, 2003), bahan sereal seperti tepung kedelai, tepung jagung, tepung gandum (Hao dkk., 2006), limbah pertanian seperti bagas, pohon jagung, jerami gandum atau jerami padi (Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006; Milala dkk., 2005; Rodrigues dkk., 2003; Ojumu dkk., 2003; Dewi, 2002a, 2002b; Dahot dan Noomrio, 1996). Muthuvelayudham dan Viruthagiri (2006) melaporkan bahwa *T. reesei* QM 9414 tumbuh baik pada glukosa, xilosa, laktosa, selulosa, bagas tebu dan jerami padi, sedangkan *T. reesei* QM 97.177 tidak tumbuh dalam jerami padi dan *T. reesei* Tm3 tidak tumbuh dalam bagas tebu.

Milala dkk. (2005) melaporkan bahwa produksi selulase menggunakan *A. niger* dari substrat limbah pertanian (jerami jagung, sekam padi, millet dan *guinea corn straw*) menunjukkan bahwa enzim dengan keaktifan tertinggi dihasilkan dari pohon jagung. Penggunaan sumber karbon yang larut seperti laktosa, selobiosa dan hidrolisat selulosa untuk produksi selulase memungkinkan produktivitas protein yang tinggi tetapi aktivitas enzimnya kurang, sedangkan sumber karbon yang sukar dirombak, produktivitas proteinnya rendah tetapi aktivitasnya tinggi (Chen dan Wayman, 1992).

### II.6.2 Enzim Xilanase

Enzim xilanase merupakan biokatalis reaksi hidrolisis xylan (hemiselulosa) menjadi gula pereduksi. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *A. niger*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Aureo-basidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola*.

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase.  $\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida (Dekker and Richards, 1976). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim  $\beta$ -xilosidase.

Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Eksoxilanase dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan menambahkan inducer xilan pada produksinya (Ratanahanokchai, 1994). Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Richana, 2002).

Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah dari golongan jamur dan bakteri. Adapun jenis jamur yang berpotensi menghasilkan enzim xilanase yaitu jamur *Trichoderma reesei*.

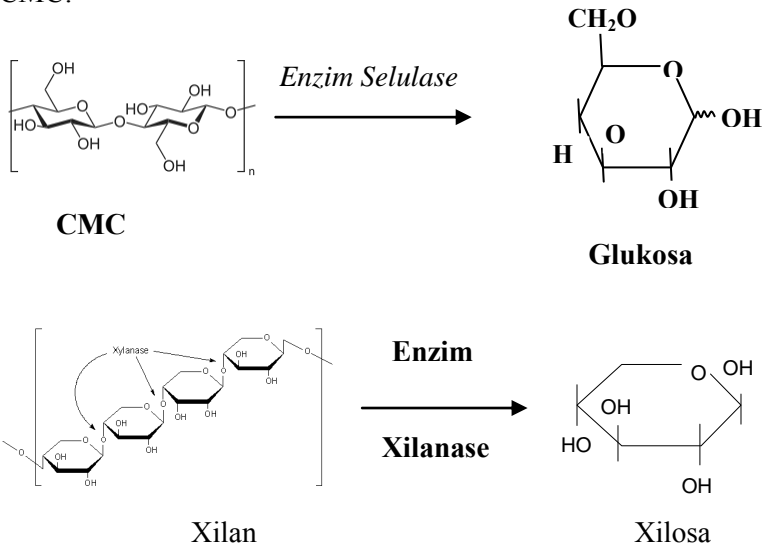
*Trichoderma* adalah suatu jamur filamen yang secara luas berada di dalam tanah, tumbuh-tumbuhan yang membusuk, dan kayu. Walaupun biasanya dianggap sebagai suatu zat-pencemar,



*Trichoderma* bisa menyebabkan infeksi/peradangan di dalam kehadiran faktor keterpengaruh tertentu. Merupakan jamur mesofilic yang tumbuh pada  $25^{\circ}\text{C}$  -  $37^{\circ}\text{C}$ , pH : 4-7 dan aerob.

## II.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dan Xilanase

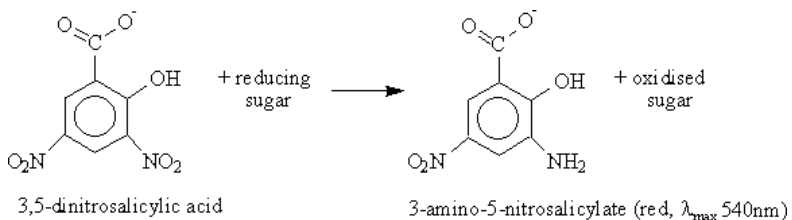
Aktivitas enzim selulase diuji dengan menggunakan larutan DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan penambahan CMC (*carboxymetil cellulose*). Sedangkan untuk aktivitas enzim xilanase juga menggunakan DNS namun dengan penambahan larutan xilan. Berikut reaksi yang terjadi setelah penambahan CMC:



**Gambar II.6 Reaksi CMC dan Xilan Menjadi Glukosa dan Xilosa**

Enzim selulase dan xilanase yang diuji aktivitasnya setelah ditambahkan CMC (untuk selulase) dan larutan xilan (untuk xilanase) maka dihasilkan glukosa dan xilosa. Setelah terbentuk glukosa dan xilosa, maka ditambahkan DNS untuk menghentikan reaksi. Bila DNS tersebut bercampur dengan gula

reduksi yaitu glukosa dan xilosa, maka akan dihasilkan zat warna merah yang selanjutnya akan diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 540 nm sehingga didapatkan nilai aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1  $\mu\text{mol}$  glukosa per menit. Reaksi dari DNS dan gula reduksi dapat dilihat dari gambar II.9 ( Miller, 1959 ).



**Gambar II.7 Reaksi DNS dan Gula Reduksi Menjadi Zat Warna Merah (3-amino-5-nitrosalicylate)**

## II.8 Hasil Penelitian Terdahulu

Pada bagian ini akan diuraikan beberapa hasil yang sudah dicapai yang merupakan dasar dari rencana penelitian secara keseluruhan.

1. Nadiem Anwar (2012) melakukan penelitian tentang produksi hidrogen dari jerami padi secara fermentasi anaerobik nonfotosintesis melalui hidrolisis. Pada proses hidrolisis enzimatis digunakan 6 variabel enzim, yaitu enzim murni, enzim kasar dari *Trichoderma reesei*, enzim kasar dari *Aspergillus niger*, enzim kasar (T/A=2/1), enzim kasar (T/A=1/1), dan enzim kasar (T/A=1/2). Dari hasil penelitian enzim yang sangat sesuai untuk menghidrolisis berbagai karbohidrat dalam jerami padi adalah enzim kasar dengan rasio Tr/An = 2/1 dengan konsentrasi gula reduksi tertinggi 8,7 g/L.
2. Mufnaiti Prihartini (2012) melakukan penelitian tentang produksi hidrogen dari jerami padi melalui hidrolisis enzimatis dan fermentasi. Pada proses hidrolisis digunakan 5

- variabel enzim, yaitu campuran enzim murni dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (2:1), enzim murni *T. ressei*, enzim murni *Aspergillus niger*, crude enzim *T. ressei*, dan campuran crude enzim *T. reesei* dan *A. niger* (2:1). Dari hasil percobaan maka enzim murni dari yang meghasilkan yield gula reduksi paling tinggi sebesar 0,2 gram gula reduksi/gram (selulosa dan hemiselulosa).
3. Lutfiana dan Winda (2011) melakukan penelitian tentang hidrolisis jerami padi secara enzimatik dengan *pretreatment* basa untuk produksi hidrogen. Pada *pretreatment* basa digunakan NaOH dengan variabel 1%, 2%, dan 4%, variabel suhu 60 °C dan 80 °C, serta variabel lama waktu pretreatment 8 jam dan 16 jam. Dari hasil penelitian untuk pretreatment basa dengan NaOH paling optimal dilakukan dengan konsentrasi 4% pada suhu 80 °C selama 8 jam yang menunjukkan peningkatan kadar selulosa lebih dari 70%. Kondisi optimal untuk hidrolisa adalah pada suhu 60°C dan pH 3 dengan hasil konsentrasi gula reduksi tertinggi yang dihasilkan hingga 10,898 g/L.
  4. Houda Boussarsar (2009) melakukan penelitian optimasi konversi bagas tebu dengan menggunakan *treatment* secara hidrotermal untuk *recovery xylose*. Proses *pretreatment* dilakukan dengan suhu 170 C selama 2 jam dan dengan waktu dan suhu sekian mendapatkan waktu optimasi.*Recovery* dari *xylose* yang tinggi dan kemurnian larutan *xylose* sebesar 78% sehingga diharapkan mempermudah pemurnian dan pemisahan dari *xylose* sebelum proses hidrogenasi.
  5. B.O. Aderemi dkk (2008) melakukan penelitian dengan bahan baku jerami padi untuk menghasilkan glukosa dengan memanfaatkan *Aspergillus Niger* yang diisolasi dari biji jagung. Yield glukosa yang dihasilkan meningkat dari 43% menjadi 87%. Besarnya rate dan konsentrasi glukosa yang dihasilkan direkayasa melalui pengolahan awal jerami padi, konsentrasi substrat, dan jumlah sel *Aspergillus Niger*.

6. Koullas D. P., dkk (1992) melakukan penelitian tentang efek dari delignifikasi basa pada sakarifikasi jerami gandum dengan enzim selulase dari strain *Fusarium Oxysporum*. Proses dilakukan dalam dua kondisi yaitu suhu panas (120°C). Pada kondisi panas NaOH yang ditambahkan masing-masing 0%, 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% dengan waktu 30 menit. Pada konsentrasi NaOH 10% didapat kadar lignin terendah yaitu 4,3% sedangkan kadar selulosa dan hemiselulosa masing-masing 37,5% dan 15%. Kadar selulosa tertinggi didapat pada konsentrasi NaOH 4% dengan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin masing-masing sebesar 44,6%; 15,4% dan 14,5%.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **III.1 Bahan dan Alat**

##### **III.1.1 Bahan Penelitian**

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah bagasse tebu, dedak gandum, jerami padi, *Potato Dextrose Agar* (Merck, Germany), agar batang, *Yeast Extract* (Becton, Dickinson and Company, France), *Dinitrosalysilic acid/DNS* (Sigma-Aldrich, Germany), aquadest, strain jamur *Trichoderma reesei* (Airlangga University, Surabaya), strain jamur *Aspergillus niger* (Biochemical Laboratory, ITS Surabaya), *carboxymetil cellulose/CMC* (Sigma-Aldrich, Germany), glukosa, xilosa,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ , Xylan from Oat Spelts (Sigma-Aldrich, Germany), asam sitrat, sodium sitrat, garam mineral untuk fermentasi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

##### **III.1.2 Alat Penelitian**

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (Astell Scientific, Inggris), *centrifuge digital* (Hermle, Jerman), *incubator shaker* (Carbolite, Inggris), *hot plate & stirrer* (Cimarec, Amerika), *spectrophotometer* (Cecil CE 1011, Inggris), *shaker* (Certomat, Jerman), *analitical balance* (Ohaus, Cina), *incubator* (Incucell, Jerman), kondensor reflux (Schott, Jerman), tabung reaksi (Pyrex Iwaki, Indonesia), labu leher dua (Schott duran, Jerman), kawat ose, gelas ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), corong kaca (Herma, Jerman), pipet ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), pipet mata, beaker glass (Schott Duran, Jerman), labu takar (Silber Brand, Jerman), erlenmeyer (Pyrex Iwaki, Indonesia), oven (VWR S/P 1350 G-2, Amerika), *vortex* (VM 300, Taiwan).

### III.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah komposisi enzim pada tahap hidrolisis bagasse tebu:

1. *Crude enzim* selulase dari jerami padi (2T:1A),
2. *Crude enzim* xilanase dari dedak gandum,
3. Campuran *crude enzim* selulase dan xilanase jerami padi/dedak gandum (2:1),
4. Enzim murni dari *T. reesei* dan *A. niger*.

### III.3 Kondisi Operasi

- Kondisi operasi pada tahap *pretreatment* bagasse tebu:
  - Ukuran partikel bagasse tebu = 100-120 mesh
  - Suhu *pretreatment* = 80°C
  - Waktu *pretreatment* = 16 jam
- Kondisi operasi pada tahap pembuatan enzim:
  - Ukuran partikel bahan baku = 100-120 mesh
  - Jenis strain = *T. reesei* dan *A. niger*
  - Suhu operasi = 32°C
  - pH = 5,5
  - Waktu inkubasi = 8 hari
- Kondisi operasi pada tahap konversi selulosa dan xilan menjadi glukosa dan xilosa oleh enzim:
  - Ukuran partikel substrat = 100 -120 mesh
  - Suhu operasi = 60°C
  - pH = 3
  - Waktu hidrolisa = 48 jam
  - Rasio enzim/*bagasse* tebu = 37,2 U/2 gr *bagasse* tebu

### III.4 Metode Penelitian

Metode penelitian dibagi dalam 3 tahap penelitian yaitu:

Tahap I: *Pretreatment* bahan baku

Pada tahap I, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. Tahap *pretreatment* mekanik (Douglas, 1988)

B. Tahap *pretreatment* kimiawi (Mosier, 2004)

C. Tahap pengujian kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin

Tahap II: Produksi enzim selulase dan xilanase dari *strain* jamur *T. reesei* dan *A. niger*.

Pada tahap II, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. Tahap persiapan

B. Tahap produksi *crude enzyme* selulase dan xilanase

C. Tahap pengujian aktivitas enzim

Tahap III: Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi oleh enzim selulase dan xilanase

Pada tahap III, penelitian dibagi menjadi dua tahapan :

A. Tahap produksi gula reduksi oleh *crude enzyme* selulase dan xilanase

B. Tahap pengujian konsentrasi gula reduksi

### **III.4.1 Tahap I: *Pretreatment* Bahan Baku**

#### **III.4.1.1 Tahap *Pretreatment* Mekanik**

Bagasse tebu dikeringkan dengan cara dijemur pada sinar matahari selama 24 jam untuk mencegah bahan baku menjadi busuk. Kemudian *bagasse* tebu dipotong dengan ukuran  $\pm 1$  cm. Lalu *bagasse* tebu digiling dengan mesin penggiling (*milling*) dan kemudian diayak dengan menggunakan *screener* dengan ukuran 100-120 mesh.

#### **III.4.1.2 Tahap *Pretreatment* Kimiawi**

##### **1. Prosedur pembuatan larutan NaOH 1 %**

NaOH kristal sebanyak 10 gram dilarutkan dengan aquadest hingga 1.000 ml. Kemudian diaduk hingga homogen.

##### **2. Prosedur *Pretreatment* secara kimiawi**

*Bagasse* tebu sebanyak 50 gram dengan ukuran 100-120 mesh dimasukkan labu leher dua kemudian ditambahkan 100 ml larutan NaOH 1%. Lalu larutan dipanaskan pada suhu 80°C selama 16 jam. Larutan *bagasse* tebu disaring. Kemudian padatan *bagasse* tebu dibilas menggunakan air

aquadest suhu 70-80°C hingga mencapai pH 7. Lalu padatan bahan baku dioven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan dan kemudian didinginkan pada suhu kamar.



**Gambar III.1 Rangkaian Alat *Pretreatment* Kimiawi *Bagasse* Tebu**

#### III.4.1.3 Tahap Pengujian Kadar Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa dengan Metode Chesson

##### 1. Prosedur pembuatan larutan $\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 N

*Aquadest* sebanyak 50 ml dimasukkan dalam beaker glass. Kemudian ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% sebanyak 2,7 ml secara perlahan dan hati-hati. Lalu Larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dalam beaker glass dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan *aquadest* kembali sampai volume 100 ml.

##### 2. Prosedur pembuatan larutan $\text{H}_2\text{SO}_4$ 72%

*Aquadest* sebanyak 20 ml dimasukkan dalam beaker glass. Kemudian ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% sebanyak 66,2 ml secara perlahan dan hati-hati. Lalu Larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dalam beaker glass dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan *aquadest* kembali sampai volume 100 ml.



3. Prosedur analisa kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin dengan metode Chesson

Langkah-langkah analisa Chesson adalah satu gram sampel kering (**berat a**) ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>O dan direfluks pada suhu 100°C dengan *waterbath* selama 1 jam. Kemudian hasilnya disaring dengan kertas saring, residu yang berada di kertas saring dicuci dengan air panas 300 ml. Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan dan ditimbang (**berat b**). Lalu residu ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N, dan direfluks dengan *oilbath* selama 1 jam pada suhu 100°C. Kemudian hasilnya disaring dan dicuci dengan air sampai netral. Residunya dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan lalu ditimbang (**berat c**). Residu kering ditambahkan 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Lalu ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks pada suhu 100°C dengan *oilbath* selama 1 jam. Kemudian residu disaring dan dicuci dengan air sampai netral. Setelah itu residu kemudian dipanaskan dengan oven dengan suhu 60°C sampai beratnya konstan lalu ditimbang (**berat d**). Selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (**berat e**).

Perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin menggunakan rumus berikut ini :

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = (b - c) / a \times 100\%$$

$$\text{Kadar Selulosa} = (c - d) / a \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin} = (d - e) / a \times 100\%$$

### III.4.2 Tahap II: Produksi Enzim Selulase dan Xilanase dari Strain Jamur *T. reesei* dan *A. niger*

#### III.4.2.1 Tahap Persiapan

1. Prosedur pembiakan jamur (*T. reesei* dan *A. niger*) pada media agar miring

PDA sebanyak 3,9 gr dilarutkan dalam 100 ml *aquadest* dengan cara diaduk sambil dipanaskan di atas *hotplate*. Lalu

ditambahkan agar batang sebanyak 6 gram hingga larut dan larutan berwarna jernih. Kemudian dituangkan dalam tiap tabung reaksi sebanyak 5 ml. Setelah itu media beserta tabung reaksi disterilisasi *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 psia selama 15 menit lalu didinginkan pada posisi miring. Kemudian jamur (*T.reesei* dan *A. niger*) dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 7 hari.

2. Prosedur pembuatan larutan buffer sitrat pH 5,5  
Asam sitrat sebanyak 5,7024 gram dan Na-sitrat sebanyak 20,6682 gram dilarutkan dalam aquadest hingga 1.000 ml. Kemudian dicek pH larutannya dengan kertas pH.
3. Prosedur pembuatan larutan buffer sitrat pH 3  
Asam sitrat sebanyak 17,87 gram dan Na-sitrat sebanyak 2,06 gram dilarutkan dalam aquadest hingga 1.000 ml. Kemudian dicek pH larutannya dengan kertas pH.
4. Prosedur pembuatan media fermentasi untuk produksi selulase dan xilanase
  1. Melakukan pembiakan strain jamur dalam media agar miring dengan media standard *Potato Dextrose Agar* (PDA) seperti dilaporkan Nakamura dan Sawada (1997).
  2. Persiapan substrat untuk pertumbuhan  
Substrat yang digunakan untuk produksi enzim selulase adalah jerami padi 100-120 mesh (Milala dkk., 2005). Substrat yang digunakan untuk produksi enzim xilanase adalah dedak gandum karena substrat ini adalah substrat terbaik seperti yang dilaporkan oleh Gawande dan Kamat (1999). Dedak gandum yang sudah dikeringkan kemudian digiling sampai ukuran partikel sesuai dengan variabel.
  3. Persiapan medium fermentasi  
Digunakan medium fermentasi media padat (*solid state fermentaion*) dengan perbandingan (jerami padi/dedak gandum : media = 5 gram : 25 mL), larutan garam mineral dan yeast ekstrak sebagai sumber nitrogen

organik untuk meningkatkan produksi enzim selulase dan xilanase.

**Tabel III.1** Komposisi Media Fermentasi untuk Produksi Enzim

Komponen	Komposisi (gr/L)
Yeast Ekstrak	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,15
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,8
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7

Mengatur pH medium pada pH 5,5 dengan menggunakan Buffer Sitrat pH 5,5. Medium fermentasi beserta substrat untuk pertumbuhan jamur dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml, kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan pada suhu ruangan.

#### III.4.2.2 Tahap Produksi *Crude Enzyme*

1. Tahap Produksi *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dan *A. niger* dengan Substrat Jerami Padi

Jamur (*T.reesei* dan *A. niger*) diinokulasikan sebanyak 2 cm<sup>2</sup> ke dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi 2 gram substrat jerami padi dan larutan garam mineral yang telah disterilkan dalam *autoclave* untuk produksi *crude enzyme* selulase. Kemudian substrat jerami padi dan larutan garam mineral yang berisi suspensi jamur diinkubasikan pada inkubator pada suhu 32°C selama 8 hari. Media fermentasi yang telah ditumbuhi jamur ditambahkan dengan 100 ml larutan buffer sitrat pH 3 yang mengandung 0,1 % Tween-80, kemudian dihomogenkan dengan orbital shaker pada 175 rpm selama 135 menit. Lalu disentrifugasi pada suhu 4°C dengan

kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring halus untuk memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media di dalamnya dimana supernatan mengandung enzim yang diproduksi dalam penelitian ini.

## 2. Tahap Produksi *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dengan Substrat Dedak Gandum

Jamur *T.reesei* diinokulasikan sebanyak 2 cm<sup>2</sup> ke dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi 2 gram substrat dedak gandum dan larutan garam mineral yang telah disterilkan dalam *autoclave*. Kemudian substrat dedak gandum dan larutan garam mineral yang berisi suspensi jamur diinkubasikan pada inkubator pada suhu 32°C selama 8 hari. Lalu media fermentasi yang telah ditumbuhi jamur ditambahkan dengan 100 ml larutan Buffer Sitrat pH 3 yang mengandung 0,1 % Tween-80, kemudian dihomogenkan pada *orbital shaker* pada 175 rpm selama 135 menit. Kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Lalu disaring dengan menggunakan kertas saring halus untuk memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media di dalamnya dimana supernatan mengandung enzim yang diproduksi dalam penelitian ini.

## 3. Tahap Pembuatan Enzim Selulase Murni dari *A. niger*

Satu gram enzim selulase dilarutkan dalam 100 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH 3 di dalam labu takar. Lalu larutan disimpan dalam erlenmeyer yang ditutup rapat dengan *proof*.

### III.4.2.3 Tahap Pengujian Aktivitas Enzim Selulase dan Xilanase

#### 1. Prosedur pembuatan reagen DNS (Arief Widjaja, 2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dalam 200 ml aquades lalu diaduk dengan stirer hingga larut. Kemudian 30 gr sodium potassium tartrate dan 8 gr sodium metabisulfit

dilarutkan ke dalam 500 ml *aquadest*. Lalu 10 gr DNS dilarutkan dengan larutan NaOH 200 ml yang telah dibuat sebelumnya hingga homogen. Setelah itu dicampur dengan larutan campuran sodium potassium tartrate dan sodium metabisulfit. Lalu ditambahkan *aquadest* hingga 1000 ml. Kemudian campuran tersebut diaduk sampai benar-benar terlarut sempurna.

2. Prosedur pembuatan CMC 1%

CMC sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 200 ml buffer sitrat pH 5,5. Lalu diaduk dengan stirrer selama 16 jam hingga homogen.

3. Prosedur pembuatan larutan *Xylan*

*Xylan from oat spelts* sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam 80 ml larutan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 pada suhu 60°C. Lalu dihomogenkan dengan stirer dan dipanaskan hingga mendidih pada *hotplate*. Kemudian larutan didinginkan dan diaduk terus hingga satu malam (12 jam) dan diencerkan hingga 100 ml dengan buffer sitrat.

4. Prosedur pembuatan kurva standard glukosa untuk mengukur aktivitas enzim selulase

Glukosa sebanyak 0,367 gram dilarutkan dengan buffer sitrat pH 5,5 hingga volume mencapai 100 ml di dalam labu ukur. Kemudian larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan buffer sitrat pH 5,5. Lalu diambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standard glukosa dan ditambahkan 1,8 ml larutan CMC 1% ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Lalu campuran tersebut divortex dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Setelah

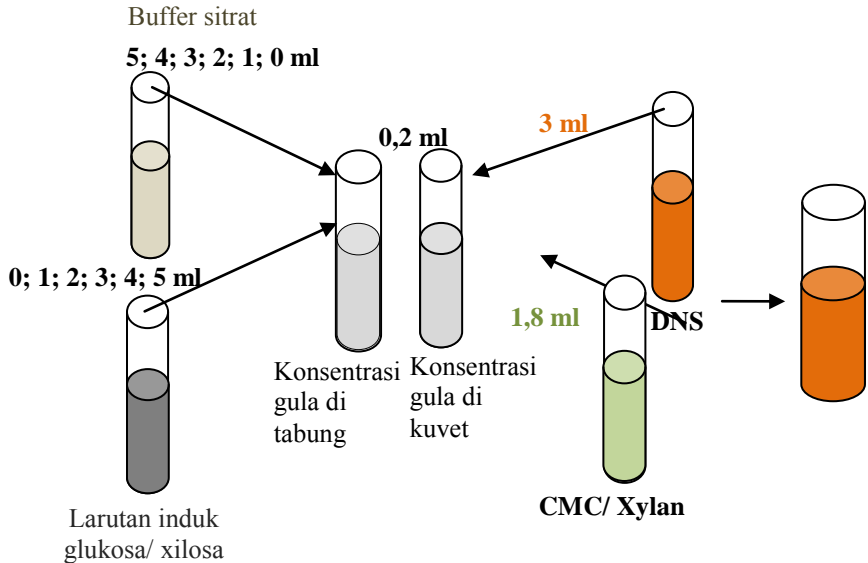
itu dibuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

**5. Prosedur pembuatan kurva standard xilosa untuk mengukur aktivitas enzim xilanase**

Xilosa sebanyak 0,367 gram dilarutkan dengan buffer sitrat pH 5,5 hingga volume mencapai 100 ml di dalam labu ukur. Kemudian larutan induk xilosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan buffer sitrat pH 5,5. Lalu diambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standard xilosa dan ditambahkan 1,8 ml larutan xylan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Lalu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Kemudian campuran tersebut divortex dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Lalu campuran didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi xilosa terhadap absorbansi.

**6. Prosedur pembuatan larutan blanko**

Larutan buffer sitrat pH 3 sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu diinkubasikan pada suhu pengujian (35°C) selama 10 menit. Kemudian ditambahkan larutan DNS 3 ml dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Lalu didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Larutan tersebut digunakan sebagai blanko (absorbansi = 0).



**Gambar III.2 Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa/Xilosa**

7. Prosedur uji aktivitas enzim selulase sebelum dikoreksi

Enzim selulase dipipet sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C. Kemudian ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi lalu divortex hingga homogen. Setelah itu campuran tersebut dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut didinginkan pada air es selama 10 menit lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

8. Prosedur uji aktivitas enzim xilanase sebelum dikoreksi

Enzim xilanase diambil sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1,8 ml larutan xilan ke dalam

tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C. Kemudian ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi lalu divortex hingga homogen. Setelah itu campuran tersebut dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut didinginkan pada air es selama 10 menit lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

9. Prosedur aktivitas enzim selulase untuk larutan koreksi

Enzim selulase diambil sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap tabung reaksi. Lalu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi lalu divortex hingga homogen. Setelah itu campuran tersebut dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut didinginkan pada air es selama 10 menit lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

$$\text{Perhitungan absorbansi (Selulase)} = \text{Absorbansi (7)} - \text{Absorbansi (9)}$$

10. Prosedur aktivitas enzim xilanase untuk larutan koreksi :

Enzim xilanase diambil sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap tabung reaksi. Lalu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi.. Kemudian ditambahkan 1,8 ml larutan xilanase ke dalam tabung reaksi lalu divortex hingga homogen. Setelah itu campuran tersebut dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut didinginkan pada air es selama 10 menit lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

$$\text{Perhitungan absorbansi (Xilanase)} = \text{Absorbansi (8)} - \text{Absorbansi (10)}$$



### **III.4.3 Tahap III: Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa Menjadi Gula Reduksi oleh Enzim Selulase dan Xilanase**

#### **III.4.3.1 Tahap hidrolisis gula reduksi oleh enzim selulase dan xilanase**

*Bagasse* tebu dengan ukuran 100-120 mesh yang telah di-*treatment* pada Tahap I diambil 2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Lalu ditambahkan enzim selulase/xilanase sesuai variabel yang didapat pada tahap II dengan rasio enzim dengan substrat sebesar 37,2 unit/2 gr *bagasse* tebu (Lutfiana dan Winda, 2011). Kemudian ditambahkan larutan buffer pH 3 hingga volume substrat 60 ml lalu dipanaskan pada suhu 60°C dan pH 3 selama 48 jam (Lutfiana dan Winda, 2011). Setelah itu, dilakukan pengambilan sampel  $\pm 3$  ml setiap jam ke-0, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48. Kemudian dilakukan sentrifugasi setiap pengambilan sampel pada *centrifuge digital* dengan suhu 4°C pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga mendapatkan larutan gula reduksi.

#### **III.4.3.2 Tahap pengujian konsentrasi gula reduksi menggunakan DNS**

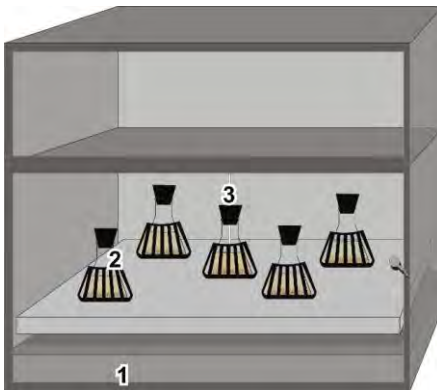
##### **1. Prosedur pembuatan kurva standar untuk mengukur konsentrasi gula reduksi**

Glukosa sebanyak 0,367 gram dilarutkan dengan buffer sitrat pH 3 hingga volume mencapai 100 ml di dalam labu ukur. Kemudian larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan buffer sitrat pH 3. Lalu diambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml larutan CMC 1% ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Lalu campuran tersebut divortex dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Lalu diukur absorbansinya menggunakan

spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

2. Prosedur pengujian konsentrasi gula reduksi

Larutan gula reduksi diambil 0,2 ml dari tiap pengambilan sampel saat hidrolisis dan ditambahkan 1,8 ml aquadest ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Lalu campuran tersebut divortex dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian campuran didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.



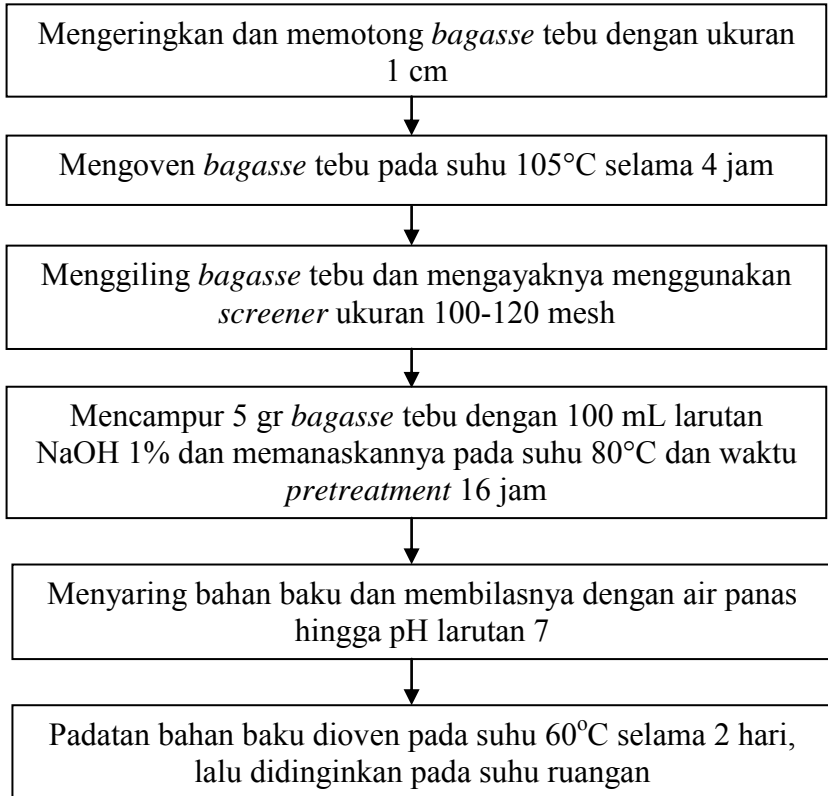
Keterangan gambar:

1. Inkubator shaker
2. Erlenmeyer berisi bahan hidrolisis
3. Proof

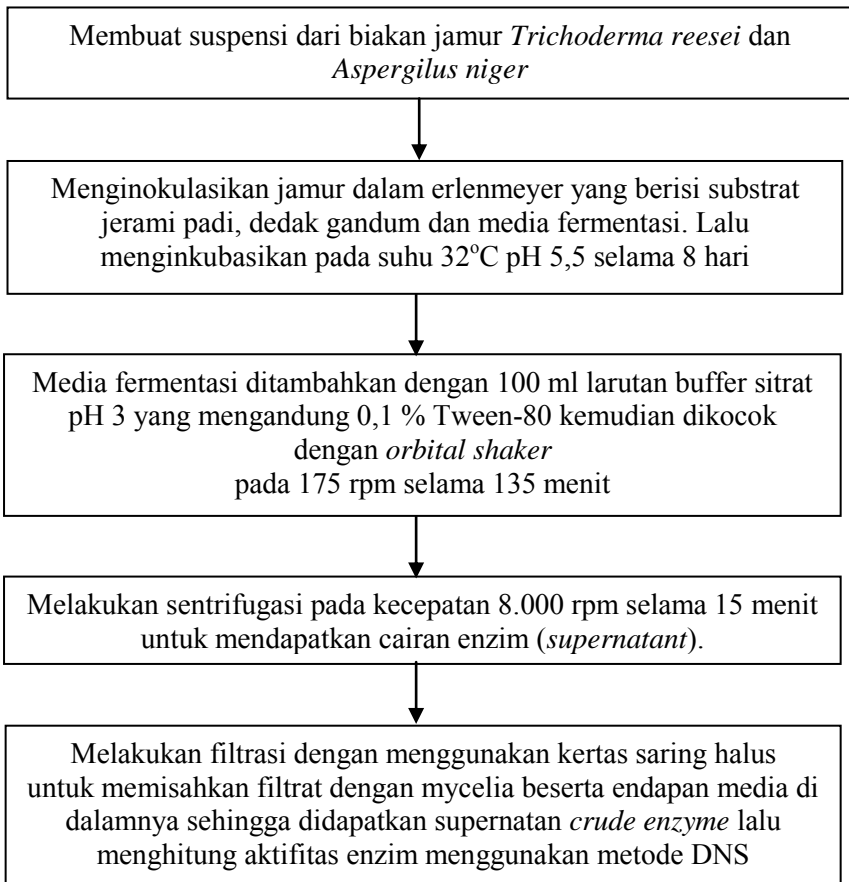
**Gambar III.3 Rangkaian Alat Hidrolisis**

### III.5 Diagram Alir Penelitian

#### III.5.1 Tahap *Pretreatment* Bahan Baku



### III.5.2 Tahap Produksi *Crude Enzyme*



### III.5.3 Tahap Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa

Menyiapkan bahan yang mengandung selulosa dan hemiselulosa yakni *bagasse* tebu ukuran 100-120 mesh yang telah di-*treatment*



Mengaplikasikan enzim selulase dan xilanase sesuai variabel yang didapat pada tahap I dengan dosis 37,2U/2 gr bahan, ditambahkan buffer sitrat pH 3 hingga 60 ml dan menginkubasikan pada suhu 60°C dengan 125 rpm

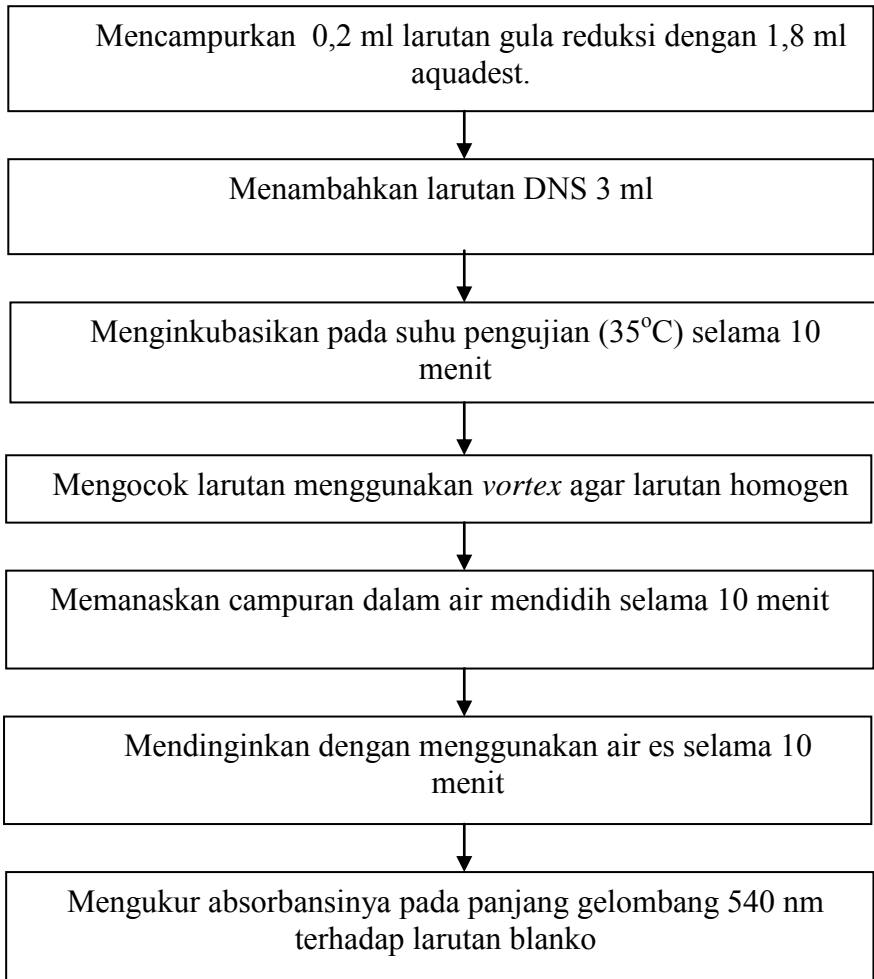


Mengambil sampel  $\pm 3$  ml pada setiap jam ke-0, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 dan 48



Melakukan sentrifugasi tiap pengambilan sampel pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga mendapatkan larutan gula reduksi

### III.5.4 Tahap Uji Konsentrasi Gula Reduksi



## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan gula reduksi dari *bagasse* tebu melalui hidrolisis enzimatis menggunakan *crude enzyme* selulase dan xilanase. Untuk menghasilkan gula reduksi terdapat beberapa tahapan proses yang harus dilakukan yaitu:

Tahap I: Pre-treatment *bagasse* tebu

Pada tahap I, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

- A. Tahap *pretreatment* mekanik (Douglas, 1988)
- B. Tahap *pretreatment* kimiawi (Mosier, 2004)
- C. Tahap pengujian kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa

Tahap II: Produksi enzim selulase dan xilanase dari *strain* jamur *T. reesei* dan *A. niger*

Pada tahap II, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

- A. Tahap persiapan
- B. Tahap produksi *crude enzyme*
- C. Tahap pengujian aktivitas enzim

Tahap III: Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi oleh enzim selulase dan xilanase

Pada tahap III, penelitian dibagi menjadi dua tahapan :

- A. Tahap produksi gula reduksi oleh *crude enzyme*
- B. Tahap pengujian konsentrasi gula reduksi

#### **IV.1 *Pretreatment Bagasse Tebu***

Proses *pretreatment bagasse* tebu pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan kimiawi dengan menggunakan NaOH 1%. Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk menghancurkan ikatan lignin sehingga komponen hemiselulosa ataupun selulosa lebih mudah untuk didegradasi.

##### **IV.1.1 *Pretreatment Mekanik***

Hal pertama yang dilakukan dalam proses *pretreatment* mekanik ini adalah *bagasse* tebu yang diperoleh dari hasil

penggilingan gula dicuci dengan air bersih. Pencucian ini bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa gula yang masih menempel pada *bagasse* karena *bagasse* diambil langsung dari tempat penggilingan gula, selain itu juga membersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel pada *bagasse* tebu sehingga diharapkan proses selanjutnya akan berjalan lebih efektif dan hasilnya maksimal. *Bagasse* tebu yang telah dicuci bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3 jam. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya pembusukan pada *bagasse* tebu, sehingga *bagasse* tebu menjadi tahan dalam jangka waktu yang lama. Selanjutnya *bagasse* tebu yang sudah dijemur, digiling dengan mesin penggiling. Lalu *bagasse* tebu dioven pada suhu 60°C selama 48 jam. Langkah terakhir pada proses *pretreatment* mekanik ini adalah *bagasse* tebu diayak sampai diperoleh ukuran sebesar 100-120 mesh. Proses pengayakan *bagasse* tebu sampai diperoleh ukuran 100-120 mesh ini bertujuan agar dapat mempermudah pada proses enzimatik oleh enzim selulase dan xilanase. Ukuran yang kecil (100-120 mesh) akan memperluas permukaan kontak antara enzim dengan *bagasse* tebu sehingga enzim dapat dengan mudah mendegradasi selulosa dan hemiselulosa yang terkandung dalam *bagasse* tebu menjadi glukosa. Dalam penelitian sebelumnya ukuran optimum untuk proses degradasi diperoleh pada ukuran 100-120 mesh. (Anwar dkk, 2011).

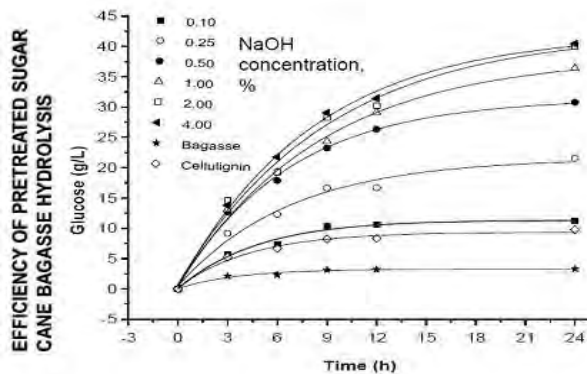
#### **IV.1.2 Pretreatment Kimiawi**

*Pretreatment bagasse* tebu secara kimiawi bertujuan untuk menghilangkan kadar lignin karena struktur lignin pada *bagasse* tebu bersifat kokoh sehingga dapat menghalangi kinerja enzim dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. Oleh sebab itu, dalam penghilangan lignin diperlukan *pretreatment* lanjutan selain *pretreatment* mekanik yaitu menggunakan *pretreatment* kimiawi. Pada *pretreatment* ini digunakan NaOH. NaOH dapat menurunkan derajat polimerisasi, meningkatkan kristalinitas dan memutus ikatan antara lignin dan karbohidrat. *Pretreatment*



*bagasse* tebu secara kimiawi ini selain untuk menghilangkan lignin juga untuk meningkatkan kereaktifan dari polisakarida yang masih terkandung di dalam *bagasse* tebu (Maeda, dkk, 2011).

Dalam *pretreatment* kimiawi ini, larutan yang digunakan adalah larutan NaOH 1%. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kondisi optimum dari hasil *pretreatment* dapat dicapai ketika menggunakan NaOH 1% (Maeda, dkk, 2011). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan Maeda (2011), *pretreatment* menggunakan NaOH dapat mempengaruhi efisiensi dari proses *pretreatment* pada hidrolisis *bagasse* tebu. Hal tersebut ditunjukkan dari grafik di bawah ini:



**Gambar IV.1 Grafik Pengaruh Konsentrasi NaOH terhadap Pretreatment**

(Sumber : Maeda dkk, 2011)

Dari grafik di atas, dapat dibaca bahwa semakin tinggi konsentrasi NaOH yang digunakan dalam proses *pretreatment*, maka efisiensi dari proses *pretreatment* pada proses hidrolisis *bagasse* tebu juga semakin baik. Hal ini ditunjukkan dengan produksi glukosa dalam satuan gram per liter (g/L) yang dihasilkan juga semakin tinggi disetiap pertambahan waktu. Begitu juga sebaliknya, jika konsentrasi NaOH semakin kecil, maka efisiensinya juga menurun, sehingga konsentrasi glukosa

juga lebih sedikit dalam waktu 24 jam. Penghilangan lignin efektif meminimalkan adsorpsi dari enzim ke lignin dan dengan demikian dapat membebaskan selulosa.

100 gram *bagasse* tebu yang telah mengalami proses *pretreatment* mekanik sehingga memiliki ukuran 100-120 mesh, dilarutkan dalam 2000 mL NaOH 1%, lalu dipanaskan pada temperatur 80°C dan diaduk dengan *stirrer* selama 16 jam. Setelah proses *pretreatment* selesai, *bagasse* tebu disaring dengan film yang luas agar mempercepat penyaringan. Selain proses penyaringan ini dilakukan juga proses pencucian dengan air panas hingga pH netral (pH 7) dan selanjutnya dikeringkan dengan oven. Massa akhir *bagasse* tebu setelah *pretreatment* sebesar 41,1 gram dengan 58,9% massa *bagasse* tebu hilang pada proses *pretreatment*. Hal ini dikarenakan adanya massa *bagasse* tebu yang lolos ketika penyaringan.

Kemudian dilakukan analisa dengan metode *Chesson* (Datta, 1981) untuk mendapatkan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin pada *bagasse* tebu. Dalam metode *Chesson* ini, digunakan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N untuk melarutkan hemiselulosa sedangkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N untuk melarutkan selulosa. Pada metode *Chesson*, setelah sampel direfluks menggunakan  $\text{H}_2\text{O}$ , sampel direfluks dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N. Dalam proses ini yang terjadi adalah pelarutan hemiselulosa yang terdapat pada sampel sehingga berat akhir sampel dari proses ini adalah berat sampel yang telah kehilangan hemiselulosa. Kemudian proses selanjutnya sampel direndam dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% kemudian ditambah  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N dan direfluks kembali, pada proses ini yang terjadi adalah pelarutan selulosa sehingga berat sampel pada proses ini adalah berat sampel yang telah kehilangan hemiselulosa dan selulosa. Kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin pada *bagasse* tebu berdasarkan hasil analisa dengan metode *Chesson* dapat dilihat pada tabel IV.1 dan gambar IV.2.

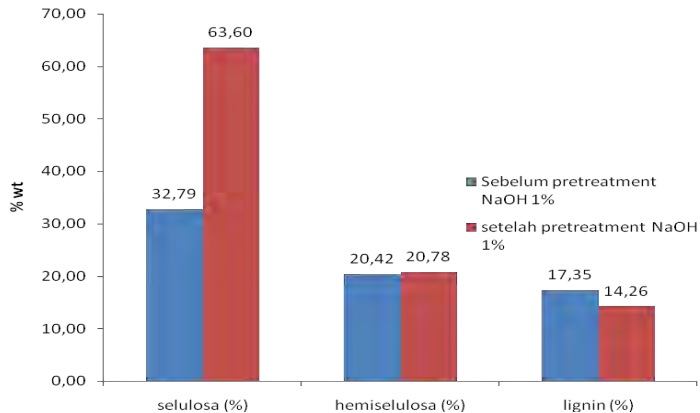
**Tabel IV.1** Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin dalam presentase massa (%w/w) dengan Metode *Chesson* dari *Bagasse* Tebu Sebelum dan Sesudah *Pretreatment* NaOH 1% pada Suhu 80°C Selama 16 Jam

No	Variabel	kadar hemiselulosa (%w/w)	kadar selulosa (%w/w)	kadar lignin (%w/w)
1.	Sebelum	20,4	32,8	17,4
2.	Sesudah	20,8	63,6	14,3

Dari tabel IV.1 dapat diperoleh bahwa konsentrasi selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami perubahan dari sebelum di-*pretreatment* dengan sesudah di-*pretreatment* dengan menggunakan NaOH 1%, dimana konsentrasi ini ditunjukkan dalam persentase berat (%w/w). Untuk bahan baku bagasse tebu yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai komposisi selulosa 32,8 %, hemiselulosa 20,4 %, dan lignin 17,4 %. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Boussarsar (2009) bagasse tebu yang digunakan oleh Boussarsar memiliki komposisi 45% selulosa, 26% hemiselulosa ,dan 20% lignin. Untuk kandungan selulosa dan lignin diantar kedua penelitian ini hampir sama namun untuk kadar hemiselulosa penelitian ini lebih kecil. Hal ini dikarenakan perbedaan sumber bahan baku bagasse tebu yang digunakan. Selain itu masih terdapatnya massa yang lolos dalam pelaksanaan analisa Chesson yang ditandai dengan besarnya standar deviasinya. Berikut merupakan perbandingan komposisi bagasse tebu dari penelitian ini dan penelitian-penelitian sebelumnya.

**Tabel IV.2** Perbandingan Komposisi Bagasse Tebu sebelum *Pretreatment* Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu

Komponen	Penelitian ini					Boussarsar	Alfariesta & Andhika
	Run I	Run II	Run III	Rata Rata	Standar Deviasi	1989	2013
% Selulosa	28,3	21,8	48,3	32,8	13,8	45	33
% Hemi-selulosa	22,1	28,8	10,4	20,4	9,3	26	37
% Lignin	14,7	18,7	18,6	17,4	2,3	20	26



**Gambar IV.2** Perbandingan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah *Pretreatment* NaOH 1% Suhu 80°C Selama 16 Jam

Berdasarkan gambar IV.2 diperoleh bahwa konsentrasi selulosa dan hemiselulosa mengalami peningkatan setelah mengalami *pretreatment*, sedangkan konsentrasi lignin mengalami penurunan. Jika digunakan NaOH dengan kadar yang lebih besar, hal ini akan mengakibatkan selulosa dan hemiselulosa banyak yang terlarut bersama dengan lignin,

sehingga akan mempengaruhi hasil akhir dalam kadar glukosa yang ingin dicapai, padahal hemiselulosa perlu dipertahankan untuk menghasilkan gula xilosa yang merupakan gula reduksi.

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ramadhan A.A dan Hendrawan A.D (2013) menggunakan NaOH 1% sebagai bahan *pretreatment bagasse* tebu, menunjukkan terjadi peningkatan kadar selulosa yang awalnya sebesar 33% (sebelum *pretreatment*) menjadi 61,9% (sesudah *pretreatment*). Adapun nilai hemiselulosa sebelum *pretreatment* sebesar 37% dan 25.7% sesudah *pretreatment*. Kadar lignin turun dari 26% (sebelum *pretreatment*) hingga 7% (sesudah *pretreatment*). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, menunjukkan tidak terjadi perbedaan yang cukup signifikan untuk kadar selulosa dan hemiselulosa di antara kedua penelitian ini. Namun untuk kadar lignin masih terdapat selisih yang cukup besar meskipun proses sebelum dan sesudah *pretreatment* tersebut dikondisikan dengan kondisi operasi yang sama. Hal ini dapat terjadi akibat ketidaksempurnaan reaksi ketika dilakukan analisa Chesson. Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuwono T dan Rolanda E (2012) menggunakan NaOH dengan konsentrasi 4%, 8% dan 12% hasil yang paling baik adalah dengan konsentrasi 4% sebesar 8,36%, namun dengan hasil tersebut masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi 1% NaOH. Adapun penelitian yang sama juga dilakukan oleh Rocha dkk. yaitu menggunakan kombinasi *steam explosion pre-treatment* dan *pretreatment* NaOH 1%. Hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Rocha adalah 86,8% selulosa, 4% hemiselulosa, dan 6,1% lignin.

**Tabel IV.3** Perbandingan Komposisi Bagasse Tebu setelah *Pretreatment* Penelitian ini dengan Penelitian Orang Lain

No Peneliti	Jenis <i>Pretreatment</i>	Kondisi Operasi	Hasil (%)
1 Penelitian ini	NaOH 1 %	Suhu 80°C, 16 jam	Selulosa = 63,595 Hemiselulosa = 20,775 Lignin = 14,26
2 Rocha dkk 2012	<sup>1</sup> Steam Explosion + <sup>2</sup> NaOH 1 %	<sup>1</sup> Tekanan 1,3 Mpa 15 menit <sup>2</sup> Suhu 100° C, 1 jam	Selulosa = 86,8 Hemiselulosa = 4 Lignin = 6,1
3 Maeda R.N dkk 2011	<sup>1</sup> 1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + <sup>2</sup> 4 % NaOH	<sup>1</sup> Suhu 121° C, 45 menit <sup>2</sup> Suhu 121° C 30 menit	Selulosa = 68.0 ± 1.3 Hemiselulosa = 12.2 ± 0.9 Lignin = 9.3 ± 0.6
4 Ramadhan dan Hedrawan , 2013	*NaOH 1 %	Suhu 80°C, 16 jam	Selulosa = 61,9 Hemiselulosa = 37 Lignin = 7
5 Yuwono dan Rolanda 2012	NaOH 4 %	Suhu 80°C, 16 jam	Selulosa = 65,97 Hemiselulosa = 16,09 Lignin = 15,17

\*Keterangan : hasil *pretreatment* yang terbaik

## **IV.2 Produksi Enzim Selulase dan Xilanase dari *Strain* Jamur *T. reesei* dan *A. niger***

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crude enzyme* dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dengan substrat jerami padi, *crude enzyme* dari *Trichoderma reesei* dengan substrat dedak gandum, dan enzim selulase murni dari *Aspergillus niger*.

### **IV.2.1 Tahap Persiapan**

Pada tahap persiapan produksi enzim selulase adalah melakukan perkembangbiakan jamur *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Larutan PDA dituangkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit yang berfungsi untuk membunuh mikroorganisme sehingga tidak terjadi kontaminasi pada *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*. Selanjutnya tabung reaksi tersebut diletakkan dalam posisi miring hingga agar menjadi padat. Kemudian strain jamur *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* diinokulasikan pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

### **IV.2.2 Tahap Produksi *Crude Enzyme***

Produksi *crude enzyme* selulase adalah dengan cara menginokulasi masing-masing *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dari agar miring sebanyak kurang lebih 2 cm<sup>2</sup> ke dalam erlenmeyer yang berisi substrat (jerami padi 100-120 mesh) dan larutan garam mineral yang telah disterilisasikan. Sedangkan produksi *crude enzyme* xilanase adalah dengan cara menginokulasi *Trichoderma reesei* dari agar miring sebanyak kurang lebih 2 cm<sup>2</sup> ke dalam erlenmeyer yang berisi substrat (dedak gandum 100-120 mesh) dan larutan garam mineral yang telah disterilisasikan. Jerami padi dan dedak gandum berfungsi sebagai sumber karbon dan substrat yang merangsang aktivitas dan produktifitas enzim. Jerami padi dipilih sebagai substrat untuk memproduksi *crude enzyme* selulase karena dapat

menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas enzim yang tinggi (Milala dkk., 2005). Dedak gandum dipilih sebagai substrat untuk memproduksi *crude enzyme* karena dedak gandum merupakan media terbaik untuk pertumbuhan jamur penghasil enzim xilanase (Gawande dan Kamat, 1999). Garam-garam mineral merupakan nutrisi medium fermentasi yang berisi larutan mineral yang dibutuhkan bagi pertumbuhan jamur. Kebutuhan akan mineral  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  dan  $Fe^{2+}$  diperlukan untuk meningkatkan aktivitas enzim xilanase. Sedangkan unsur N, P, dan K dapat berfungsi sebagai mineral penginduksi (Ratanakhanokchai, 1999).

Substrat dan larutan garam mineral yang telah diinokulasikan jamur diinkubasi pada suhu 30°C selama 8 hari. Setelah itu, enzim yang dihasilkan diekstrak dengan menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 3 sebanyak 100 ml yang mengandung 0,1% *Tween* 80, lalu di-*shaker* dengan kecepatan 175 rpm selama 135 menit. *Tween* 80 ini berperan sebagai surfaktan yang fungsinya untuk menurunkan tegangan permukaan sel, sehingga sel dapat dengan mudah mengeluarkan cairan metabolit yang ada di dalamnya. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan *centrifuge* pada suhu 4°C dan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan cairan *crude enzyme*. Setelah itu melakukan filtrasi dengan kertas saring untuk memisahkan filtrat dengan *mycelia* beserta endapan media. Hasil filtrasi berupa supernatan yaitu cairan bening yang berfungsi sebagai *crude enzyme* dan digunakan dalam penelitian ini. Sedangkan untuk enzim selulase murni dari *A. niger* dapat dibuat dengan cara dilarutkan dalam buffer sitrat pH 3.

#### **IV.2.3 Tahap Pengujian Aktivitas *Crude Enzyme***

Setelah mendapatkan enzim, maka proses selanjutnya adalah pengujian aktivitas enzim selulase dan xilanase. Sebelum menguji aktivitas enzim, harus membuat kurva standar glukosa dan xilosa terlebih dahulu. Kurva standar glukosa dapat dibuat dengan cara melarutkan 0,367 gram glukosa dalam 100 ml buffer sitrat pH 5,5. Lalu larutan induk glukosa tersebut diencerkan pada



berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan buffer sitrat pH 5,5. Kemudian 0,2 ml dari tiap konsentrasi standar glukosa diambil dan ditambahkan 1,8 ml CMC. Lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C dan ditambahkan 3 ml DNS. Setelah itu dipanaskan ke dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan ke dalam air es selama 10 menit, setelah itu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian membuat kurva kalibrasi antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa, sehingga didapatkan kurva standar glukosa untuk menguji keaktifan enzim selulase. Untuk kurva standar xilosa dilakukan dengan cara yang sama namun menggunakan larutan induk xilosa yang terdiri dari campuran 0,367 gram xilosa dalam 100 ml buffer sitrat pH 5,5. Kemudian setelah larutan induk xilosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan buffer sitrat pH 5,5 diambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi standar xilosa dan ditambahkan 1,8 ml larutan xilan. Lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C dan ditambahkan 3 ml DNS. Setelah itu dipanaskan ke dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan ke dalam air es selama 10 menit, setelah itu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian membuat kurva kalibrasi antara absorbansi dengan konsentrasi xilosa, sehingga didapatkan kurva standar xilosa untuk menguji keaktifan enzim xilanase.

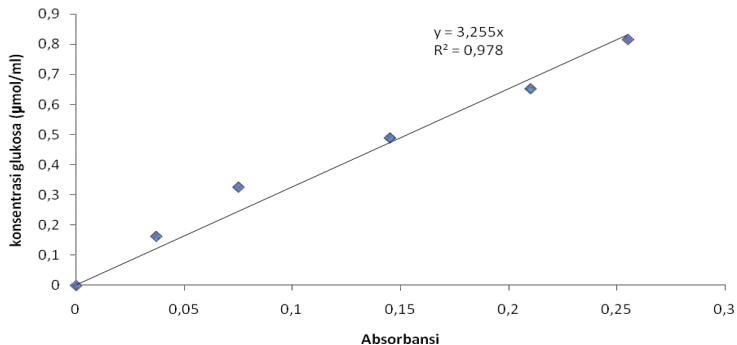
**Tabel IV.4** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase

Larutan Induk Glukosa 0,02 M (ml)	Buffer Sitrat (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/ml}$ )		Absorbansi
					Di tabung <sup>1)</sup>	Di kuvet <sup>2)</sup>	
0	5	0,2	1,8	5	0,000	0,000	0
1	4	0,2	1,8	5	4,078	0,163	0,037
2	3	0,2	1,8	5	8,156	0,326	0,075
3	2	0,2	1,8	5	12,233	0,489	0,145
4	1	0,2	1,8	5	16,311	0,652	0,210
5	0	0,2	1,8	5	20,389	0,816	0,255

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan glukosa dan buffer sitrat

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan CMC dan DNS

Dari tabel IV.4 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam kuvet sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Setelah itu ditarik suatu regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa.



**Gambar IV.3** Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase

Dari gambar IV.3 didapatkan persamaan regresi linier  $y = 3,255x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi glukosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi. Slope dari persamaan tersebut akan berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi konsentrasi glukosa yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim pada langkah selanjutnya.

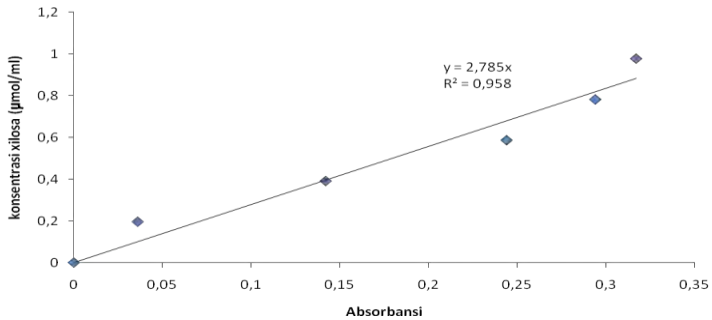
**Tabel IV.5** Perhitungan Kurva Standar Xilosa (dengan Xilan) Untuk Menguji Aktivitas Enzim Xilanase

Larutan Xilosa 0,024 M (ml)	Buffer Sitrat (ml)	Diambil (ml)	Xilan (ml)	V total (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/ml}$ )		Absorbansi
					Di tabung <sup>1)</sup>	Di kuvet <sup>2)</sup>	
0	5	0,2	1,8	5	0,000	0,000	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,078	0,196	0,036
2	3	0,2	1,8	5	8,156	0,391	0,142
3	2	0,2	1,8	5	12,233	0,587	0,244
4	1	0,2	1,8	5	16,311	0,783	0,294
5	0	0,2	1,8	5	20,389	0,979	0,317

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan xilosa dan buffer sitrat

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan xilan dan DNS

Dari tabel IV.5 dapat dibuat kurva standar xilosa dengan cara mengeplot data konsentrasi xilosa dalam kuvet sebagai sumbu  $y$  dan data absorbansi sebagai sumbu  $x$ . Setelah itu ditarik suatu regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar xilosa.



**Gambar IV.4 Kurva Standar Xilosa (dengan Xilan) untuk Menguji Aktivitas Enzim Xilanase**

Dari gambar IV.4 didapatkan persamaan regresi linier  $y = 2,785x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi xilosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi. Slope dari persamaan tersebut akan berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi konsentrasi xilosa yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim pada langkah selanjutnya.

Dari kurva standar glukosa dan xilosa yang telah didapat, langkah selanjutnya adalah menguji aktivitas enzim. Aktivitas enzim diuji dengan metode DNS dan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm. Kedua kurva di atas (Gambar IV.3 dan Gambar IV.4) diperoleh dari larutan glukosa dan xilosa yang dicampur masing-masing dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC) dan xilan. CMC digunakan karena CMC dapat dihidrolisis oleh enzim selulase sehingga dihasilkan glukosa, sedangkan xilan dihidrolisis oleh xilanase menjadi xilosa. Dari hal tersebut, dapat diketahui bagaimana dan berapa aktivitas enzim tersebut. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari enzim selulosa dan xilanase adalah 540 nm karena pada  $\lambda$  tersebut, reaksi gula reduksi dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan sehingga dapat terbaca absorbansinya oleh gelombang 540 nm (Miller, 1959).

**Tabel IV.6** Pengukuran Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dengan Substrat Jerami Padi

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
Selulase	0,12	0,08	0,035	3,25	0,28
Xilanase	0,72	0,60	0,114	2,78	0,79

Keterangan : A<sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi  
 A<sub>2</sub> : Absorbansi larutan koreksi  
 (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Dari tabel IV.6 didapatkan *crude enzyme T. reesei* memiliki aktivitas xilanase yang lebih tinggi daripada aktivitas selulasenya. Hal ini berbeda dengan harapan awal aktivitas selulase yang lebih tinggi karena dengan substrat jerami padi dapat menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas enzim yang tinggi (Milala dkk., 2005). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mufnaiti Prihartini (2012) *crude enzyme T. reesei* substrat jerami padi yang dihasilkan memiliki aktivitas selulase sebesar 1,320 U/ml dan aktivitas xilanase 0,249 U/ml. *Crude enzyme T. reesei* substrat jerami padi juga digunakan pada penelitian lain yang dilakukan oleh Lutfiana dan Winda (2011) dan memiliki aktivitas selulase sebesar 1,36 U/ml. Perbedaan ini dikarenakan oleh perbedaan strain jamur *Trichoderma reesei* yang digunakan.

**Tabel IV.7** Pengukuran Aktivitas *Crude Enzyme* dari *A. niger* dengan Substrat Jerami Padi

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
Selulase	0,18	0,07	0,11	3,25	0,89
Xilanase	0,67	0,17	0,50	2,78	3,48

Keterangan : A<sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi  
 A<sub>2</sub> : Absorbansi larutan koreksi  
 (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Dari tabel IV.7, didapatkan *crude enzyme A. niger* memiliki aktivitas xilanase yang lebih tinggi daripada aktivitas selulasenya. Hal ini berbeda dengan harapan awal aktivitas selulase yang lebih tinggi karena dengan substrat jerami padi dapat menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas enzim yang tinggi (Milala dkk., 2005). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lutfiana dan Winda (2011) *crude enzyme A. niger* substrat jerami padi yang dihasilkan memiliki aktivitas selulase sebesar 0,71 U/ml. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, menunjukkan aktivitas enzim selulase yang lebih baik daripada penelitian sebelumnya.

**Tabel IV.8** Pengukuran Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dengan Substrat Dedak Gandum

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
Selulase	0,40	0,33	0,07	3,25	0,59
Xilanase	1,69	0,44	1,25	2,78	8,72

Keterangan : A<sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi  
 A<sub>2</sub> : Absorbansi larutan koreksi  
 (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Dari tabel IV.8, dapat didapatkan *crude enzyme T. reesei* memiliki aktivitas xilanase yang lebih tinggi daripada aktivitas selulasenya. Hal ini sesuai dengan harapan awal aktivitas xilanase yang lebih tinggi karena dengan substrat dedak gandum merupakan media terbaik untuk pertumbuhan jamur penghasil enzim xilanase (Gawande dan Kamat, 1999). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mufnaiti Prihartini (2012) *crude enzyme T. reesei* dedak gandum yang dihasilkan memiliki aktivitas xilanase sebesar 5,31 U/ml dan aktivitas selulase 2,21 U/ml. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, menunjukkan aktivitas enzim xilanase yang lebih baik daripada penelitian sebelumnya.

**Tabel IV.9** Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Murni dari *A.niger*

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
Selulase	0,54	0,22	0,32	3,25	2,58
Xilanase	1,29	0,80	0,49	2,78	3,43
Keterangan	: A <sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi : A <sub>2</sub> : Absorbansi larutan koreksi (A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> ) : Absorbansi larutan setelah koreksi				

Dari tabel IV.9, didapatkan enzim selulase murni *A. niger* memiliki aktivitas xilanase yang lebih tinggi daripada aktivitas selulasenya. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Alfariesta dan Andika (2013), enzim selulase murni *A. niger* yang digunakan memiliki aktivitas selulase sebesar 2,08 U/ml dan aktivitas xilanase sebesar 3,28 U/ml. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, menunjukkan aktivitas enzim selulase yang tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya. Secara ringkas perbandingan aktivitas enzim penelitian ini dengan penelitian orang lain dapat dilihat pada tabel IV.10.

**Tabel IV.10** Perbandingan Aktivitas Enzim Penelitian ini dengan Penelitian Orang Lain

No	Peneliti/Tahun	Kondisi Operasi	Hasil Aktivitas Enzim
1.	Penelitian ini	Jenis strain: <i>T. reesei</i> dan <i>A. niger</i> Suhu: 32°C pH: 5,5 Waktu inkubasi: 8 hari	➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>T. reesei</i> dengan substrat jerami padi: selulase = 0,28 U/ml xilanase= 0,79 U/ml ➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>A. niger</i> dengan substrat jerami padi: selulase = 0,89U/ml xilanase= 3,48 U/ml

			<p>➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>T. reesei</i> dengan substrat dedak gandum: selulase = 0,59U/ml xilanase= 8,72 U/ml</p> <p>➤ Enzim Selulase Murni dari <i>A. niger</i>: selulase = 2,58 U/ml xilanase= 3,43 U/ml</p>
2.	Mufnaiti (2012)	<p>Jenis strain: <i>T. reesei</i> dan <i>A. niger</i> Suhu: 30°C pH: 5,5 Waktu inkubasi: 7 hari</p>	<p>➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>T. reesei</i> dengan substrat jerami padi: selulase = 1,32 U/ml xilanase= 0,25 U/ml</p> <p>➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>T. reesei</i> dengan substrat dedak gandum: selulase = 2,21 U/ml xilanase= 5,31 U/ml</p>
3.	Lutfiana & Winda (2013)	<p>Jenis strain: <i>T. reesei</i> dan <i>A. niger</i> Suhu: 30°C pH: 5,5 Waktu inkubasi: 7 hari</p>	<p>➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>T. reesei</i> dengan substrat jerami padi: selulase = 1,36 U/ml</p> <p>➤ <i>Crude enzyme</i> dari <i>A. niger</i> dengan substrat jerami padi: selulase = 0,71U/ml</p>
4.	Alfariesta & Andhika (2013)		<p>➤ Enzim Selulase Murni dari <i>A. niger</i>: selulase = 2,08 U/ml xilanase= 3,28 U/ml</p>



Dari hasil perhitungan aktivitas enzim tersebut, dapat dilakukan perhitungan untuk kebutuhan enzim dalam penelitian ini dimana akan digunakan empat macam variabel enzim untuk proses hidrolisis dan setiap variabel memiliki jumlah kebutuhan enzim yang berbeda-beda. Dari perhitungan didapat kebutuhan enzim untuk masing-masing variabel pada Tabel IV.11.

Pada prosedur untuk tahap hidrolisis, ditetapkan untuk konsentrasi enzim yang digunakan sebesar 37,2U/2 gram *bagasse* tebu maka larutan total enzim beserta buffer sitrat pH 3 yang digunakan pada hidrolisis adalah 60 ml. Namun karena aktivitas *crude enzyme* yang relatif rendah maka volume larutan menjadi semakin besar. Hal ini dapat dilihat pada tabel IV.11 yang berdasarkan aktivitas *crude enzyme* maka total kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* selulase (2T:1A) dan *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase membutuhkan masing-masing enzim sebanyak 101,01 ml dan 68,76 ml. Oleh karena itu untuk kedua variabel tersebut tanpa diberikan tambahan buffer sitrat pH 3.

**Tabel IV.11** Kebutuhan Enzim pada Setiap Variabel Enzim untuk Hidrolisis

Variabel Enzim	Komposisi Enzim	Aktivitas Enzim	Kebutuhan Enzim (ml)	Total Volume (ml)
<i>Crude enzyme</i> selulase (2T:1A)	<i>Crude enzyme T. reesei</i> Substrat Jerami Padi	0,28	87,08	101,01
	<i>Crude enzyme A. niger</i> Substrat Jerami Padi	0,89	13,94	
	<i>Crude enzyme T. reesei</i> Substrat Dedak Gandum	8,72	4,27	4,27

Crude enzyme 2 Selulase (2T:1A) : 1 Xilanase	Crude enzyme <i>T. reesei</i> Substrat Jerami Padi	0,28	58,05	68,76
	Crude enzyme <i>A. niger</i> Substrat Jerami Padi	0,89	9,29	
	Crude enzyme <i>T. reesei</i> Substrat Dedak Gandum	8,72	1,42	
Enzim selulase murni <i>A. niger</i>	Enzim selulase murni <i>A. niger</i>	2,58	14,42	14,42

### IV.3 Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa Menjadi Gula Reduksi oleh Enzim Selulase dan Xilanase

Dalam hidrolisis *bagasse* tebu ini yang perlu dipersiapkan pertama kali yaitu kurva standar glukosa yang berfungsi untuk menguji konsentrasi gula reduksi pada saat proses hidrolisis berlangsung. Dalam pembuatan kurva ini, tidak digunakan *Carboxymetil Cellulose* (CMC), tetapi hanya menggunakan *aquadest*. Hal ini dikarenakan CMC hanya diperlukan untuk mengetahui aktivitas enzim.

**Tabel IV.12** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi dari Hasil Hidrolisis *Bagasse* Tebu

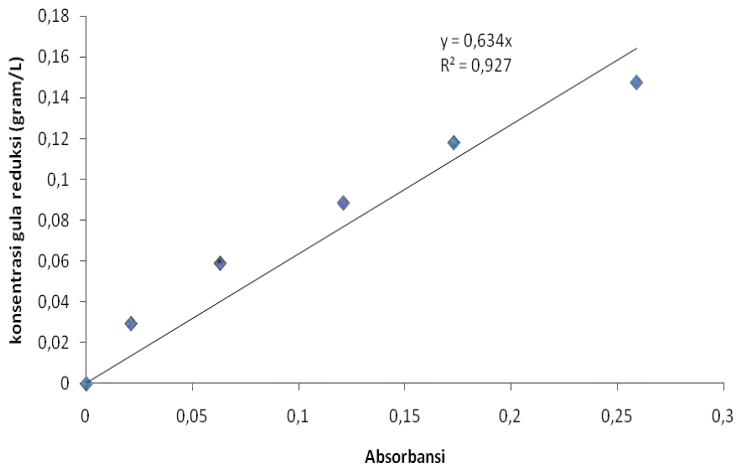
Larutan Glukosa 0,02 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	<i>Aquadest</i> (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (gram/L)		Absorbansi
					Di tabung <sub>1)</sub>	Di kuvet <sub>2)</sub>	
0	5	0,2	1,8	5	0	0	0,02
1	4	0,2	1,8	5	0,74	0,03	0,02

2	3	0,2	1,8	5	1,47	0,06	0,06
3	2	0,2	1,8	5	2,21	0,09	0,12
4	1	0,2	1,8	5	2,95	0,12	0,17
5	0	0,2	1,8	5	3,68	0,15	0,26

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan glukosa dan buffer sitrat pH 3

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan aquadest dan DNS

Dari tabel IV.12 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam kuvet sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Setelah itu ditarik suatu regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa (tanpa CMC) untuk pengujian gula reduksi hasil hidrolisis.



**‘Gambar IV.5 Kurva Standar Glukosa (tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Bagasse Tebu**

Dari gambar IV.5 didapatkan persamaan regresi linier  $y = 0,634x$  dengan y sebagai konsentrasi glukosa (gram/L) dan x sebagai absorbansi. Slope dari persamaan tersebut akan berfungsi

sebagai konversi data dari absorbansi menjadi konsentrasi gula reduksi yang digunakan untuk mengukur konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis *bagasse* tebu pada langkah selanjutnya.

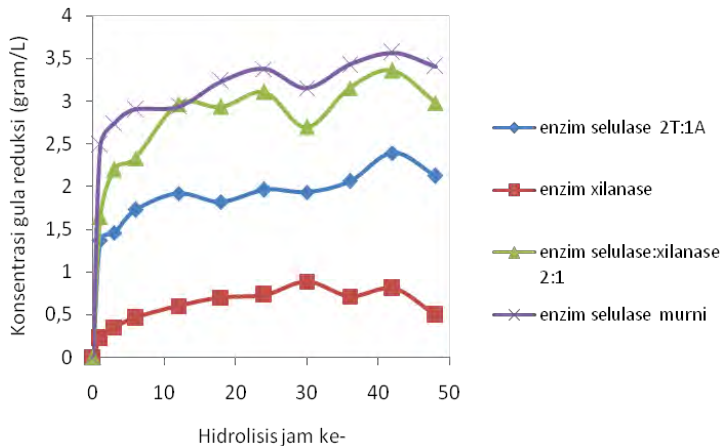
Kondisi operasi dari proses hidrolisis ini adalah menggunakan temperatur 60°C dan pH 3. Kondisi hidrolisis ini ditetapkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa aktivitas enzim akan optimum pada suhu tinggi dengan pH rendah (Anwar dkk., 2011).

Dalam proses hidrolisis *bagasse* tebu ini digunakan 4 variabel enzim, yaitu *crude enzyme* selulase (2T:1A), *crude enzyme* xilanase *T. reesei*, *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase dan enzim selulase murni *A. niger*. Konsentrasi enzim yang digunakan untuk hidrolisis sama, yaitu 37,2 U/2 gr *bagasse* tebu, tetapi aktivitas antara enzim selulase dan xilanase yang digunakan berbeda-beda, sehingga kebutuhannya juga menjadi berbeda.

Setelah diketahui kebutuhan enzimnya, lalu ditambahkan dengan buffer sitrat 0,1 M pH 3 ke dalam campuran enzim hingga 60 ml. Namun untuk variabel yang kebutuhan enzimnya telah melebihi volume 60 ml dapat langsung digunakan tanpa ditambahkan lagi buffer sitrat pH 3. Lalu 2 gr *bagasse* tebu ke dalam erlenmeyer 250 mL dan dicampur dengan variabel enzim yang telah dipersiapkan. Setelah tercampur, pH dicek dengan menggunakan kertas indikator. Setelah itu larutan dimasukkan dalam *inkubator shaker* pada temperatur 60°C dan kecepatan 125 rpm selama 48 jam.

Analisa konsentrasi gula reduksi dalam hidrolisat dengan metode DNS dilakukan pada setiap sampel pada jam ke-0, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48. Untuk mengukur absorbansi pada jam ke-0, digunakan *bagasse* tebu hasil *pretreatment* yang dicampurkan dengan *aquadest*, tanpa menambahkan enzim dan buffer sitrat pH 3. Sampel sebanyak 3 ml diambil dengan pipet mata, lalu memasukkannya ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk merusak enzim masih ada pada sampel sehingga

tidak terjadi proses hidrolisis lebih lanjut. Untuk selanjutnya dimasukkan dalam *microtube* dan ditimbang hingga memiliki massa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama dengan ketelitian 0,1 gram. Hal ini bertujuan agar proses sentrifugasi memiliki keseimbangan yang sempurna untuk proses pemisahan larutan sampel. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan sebesar 10.000 rpm pada *centrifuge*. Hal ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan dan cairan pada hidrolisat, karena dibutuhkan hasil sentrifugasi (*liquid*) yang murni yang dianalisa dengan menggunakan metode DNS. Setelah itu 0,2 ml larutan setiap sampel hasil sentrifugasi (*liquid*) ditambah 1,8 ml *aquadest* dan DNS sebanyak 3 ml, lalu divortex supaya larutan menjadi homogen. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan di air mendidih selama 10 menit. Kemudian didinginkan di air es selama 10 menit. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan, diperoleh hasil sebagai berikut :



**Gambar IV.6 Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel Enzim pada *Bagasse* Tebu Pretreatment NaOH 1%**

Dari gambar IV.6 terlihat bahwa nilai konsentrasi gula reduksi mengalami peningkatan yang sangat signifikan pada jam

ke-1 lalu sedikit demi sedikit terus meningkat hingga jam ke-42. Pada keseluruhan variabel enzim, memiliki kecenderungan peningkatan untuk menghasilkan gula reduksi yang berarti enzim yang digunakan mampu menghidrolisis *bagasse* tebu. Peningkatan tertinggi dari masing-masing variabel terjadi pada jam ke-42. Dari gambar IV.5 urutan enzim terbaik yang digunakan untuk hidrolisis *bagasse* tebu dilihat dari perolehan konsentrasi gula reduksi berturut-turut yaitu enzim selulase murni *A. niger* dengan konsentrasi gula reduksi 3,566 g/L, *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase dengan konsentrasi gula reduksi 3,360 g/L, *crude enzyme* selulase (2T:1A) dengan konsentrasi gula reduksi 2,393 g/L, dan *crude enzyme* xilanase *T. reesei* dengan konsentrasi gula reduksi 0,808 g/L. Dapat dilihat bahwa hidrolisis menggunakan enzim selulase murni *A. niger* menghasilkan konsentrasi gula reduksi paling tinggi. Perolehan konsentrasi gula reduksi ini lebih baik daripada variabel enzim yang lain disebabkan adanya aktivitas enzim yang tinggi dari *A. niger*, sehingga makin tinggi pula konsentrasi gula yang dihasilkan. Ditunjukkan pula pada gambar tersebut bahwa konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan pada hidrolisis *bagasse* tebu oleh tiap enzim berbeda meskipun konsentrasi enzim dalam massa *bagasse* tebu sama, yaitu 37,2 U/ 2 gram *bagasse* tebu. Selain itu, dari gambar IV.6 juga dapat diketahui bahwa di antara variabel *crude enzyme* yang digunakan, konsentrasi gula reduksi tertinggi dicapai oleh penggunaan *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase dengan konsentrasi gula reduksi 3,360 g/L. Hasil yang didapat tidak jauh berbeda dengan hasil konsentrasi gula reduksi yang didapat dengan menggunakan enzim murni selulase dari *A. niger*. Namun karena volume larutan hidrolisis yang berbeda maka belum dapat ditarik kesimpulan bahwa enzim selulase murni *A. niger* yang terbaik dalam menghidrolisis *bagasse* tebu.

Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mufnaiti Prihartini (2012) enzim yang terbaik dalam menghidrolisis jerami padi adalah enzim murni *A. niger* dengan konsentrasi gula

reduksi sebesar 6 gram/L dalam 150 ml larutan hidrolisis dengan substrat sebanyak 5 gram jerami padi. Dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Arief dan Aliyah (2013) enzim yang terbaik dalam menghidrolisis *bagasse* tebu adalah campuran enzim murni selulase *A. niger* dan xilanase *T. longibrachiatum* dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 10,123 gram/L dalam 700 ml larutan hidrolisis dengan substrat sebanyak 23 gram *bagasse* tebu. Jika dibandingkan dengan kedua penelitian tersebut, penelitian ini menghasilkan konsentrasi gula reduksi yang lebih kecil dikarenakan perbedaan enzim dari *strain* jamur yang digunakan. Selain itu volume larutan hidrolisis yang digunakan juga lebih besar akibat aktivitas enzim yang rendah sehingga menimbulkan konsentrasi gula yang lebih rendah.

Dari proses hidrolisis ini dapat dihitung yield gula reduksi berdasarkan konsentrasi gula reduksi hidrolisat yang telah didapat. Berikut ini merupakan hasil perhitungan yield ( $\frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{gram bagasse tebu}}$ ) pada tiap variabel enzim.

**Tabel IV.13** Yield Gula Reduksi Hasil Hidrolisis *Bagasse* Tebu pada Tiap Variabel Enzim

Variabel Enzim	Yield
<i>Crude enzyme</i> selulase (2T:1A)	0,163
<i>Crude enzyme</i> xilanase	0,029
<i>Crude enzyme</i> 2 Selulase (2T:1A) : 1 Xilanase	0,137
Enzim selulase murni <i>A. niger</i>	0,127

Dari tabel IV.13 *crude enzyme* selulase (2T:1A) memiliki yield gula reduksi yang paling besar diantara variabel enzim lainnya. Meskipun dari hasil perhitungan konsentrasi gula reduksi yang memiliki hasil terbaik adalah hidrolisis menggunakan enzim selulase murni *A. niger*. Namun karena volume larutan hidrolisis

yang berbeda maka yield yang terbesar dimiliki oleh variabel *crude enzyme* selulase (2T:1A) sebesar 0,163 gram gula reduksi/gram (selulosa+hemiselulosa) *bagasse* tebu. Hal ini menunjukkan bahwa sinergisitas antara enzim selulase, xilanase, dan enzim-enzim lainnya yang terdapat pada *crude enzyme* dalam proses hidrolisis tercapai dimana dikarenakan adanya enzim-enzim tersebut, hemiselulosa akan terpecah menjadi xilosa, arabinosa dan monomer gula lainnya, sehingga jumlah gula reduksi yang dihasilkan menjadi lebih besar daripada ketika menggunakan satu enzim tunggal atau enzim murni saat hidrolisis. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Anwar Nadiem (2012) yield gula reduksi yang terbaik adalah hidrolisis yang menggunakan *crude enzyme* (2T:1A) dengan yield sebesar 0,36 g gula reduksi/g jerami padi. Jika dibandingkan dengan penelitian ini maka yield gula reduksinya lebih rendah daripada penelitian sebelumnya. Hal ini dikarenakan rendahnya aktivitas *crude enzyme* yang dihasilkan sehingga kurang optimal dalam reaksi hidrolisis *bagasse* tebu.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang dilakukan maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Bagasse tebu yang digunakan memiliki kandungan selulosa sebesar 32,8%, hemiselulosa 20,4%, dan lignin 17,4%.
2. Hasil *pretreatment* kimia *bagasse* tebu menggunakan NaOH 1% dengan suhu 80°C selama 16 jam diperoleh kandungan selulosa sebesar 63,60%, hemiselulosa 20,78%, dan lignin 14,26%.
3. *Crude enzyme* dengan substrat jerami padi dari *T. reesei* memiliki aktivitas enzim selulase 0,285 U/ml dan xilanase 0,794 U/ml, sedangkan dari *A. niger* memiliki aktivitas enzim selulase 0,890 U/ml dan xilanase 3,481 U/ml.
4. *Crude enzyme* dari *T. reesei* dengan substrat dedak gandum memiliki aktivitas enzim selulase 0,586 U/ml dan xilanase 8,715 U/ml.
5. Hasil hidrolisis terbaik dilihat dari perolehan konsentrasi gula reduksi adalah dengan menggunakan enzim selulase murni yaitu didapatkan konsentrasi gula reduksi sebesar 3,566 g/L.
6. Hasil hidrolisis terbaik di antara penggunaan *crude enzyme* adalah dengan menggunakan *crude enzyme* 2 selulase (2T:1A) / 1 xilanase yaitu didapatkan konsentrasi gula reduksi 3,360 g/L.
7. Yield gula reduksi yang paling besar adalah pada penggunaan *crude enzyme* selulase (2T:1A) yaitu didapatkan yield sebesar 0,163 gram gula reduksi/gram (selulosa+hemiselulosa) *bagasse* tebu.

**V.2 Saran**

1. Perlu diperhatikan saat penyaringan pada *pretreatment*, pH air cucian harus netral atau pH 7.
2. Pada saat analisa Chesson, diperlukan ketelitian yang sangat tinggi pada tiap prosedurnya untuk menghindari data yang kurang akurat.
3. Perlu diteliti kembali mengenai kondisi optimum dalam menghasilkan *crude enzyme*
4. Perlu diteliti kembali untuk *strain* jamur *A. niger* dan *T. reesei* untuk produksi *crude enzyme* yang optimal

**APPENDIKS A**  
**A-1**  
**PERHITUNGAN KADAR SELULOSA, HEMISELULOSA,**  
**DAN LIGNIN PADA BAGASSE TEBU MENGGUNAKAN**  
**METODE CHESSON**

**A.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin**

*Bagasse Tebu Sebelum Pretreatment*

**1. Perhitungan Kadar Selulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,717-0,220)/1,030 \times 100\% \\ &= 48,262\%\end{aligned}$$

**2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,824-0,717)/1,030 \times 100\% \\ &= 10,406\%\end{aligned}$$

**3. Perhitungan Kadar Lignin**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,220-0,028)/1,030 \times 100\% \\ &= 18,608\%\end{aligned}$$

**A.2 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada**  
*Bagasse Tebu Setelah Pretreatment NaOH 1%*

**1. Perhitungan Kadar Selulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,784-0,148)/1,001 \times 100\% \\ &= 63,595\%\end{aligned}$$

**2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa**

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,992-0,784)/1,001 \times 100\% \\ &= 20,775\%\end{aligned}$$

## 3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\
 &= (0,148-0,005)/1,001 \times 100\% \\
 &= 14,260 \%
 \end{aligned}$$

**A-2**

**PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA DAN  
XILOSA  
UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM**

## A.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\begin{aligned}
 \text{Massa glukosa} &= 0,367 \text{ gram} \\
 \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\
 \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\
 \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\
 &= 0,367 \text{ gram} / 180 \text{ gram/mol} \\
 &= 0,002 \text{ mol} \\
 &= 2038,89 \mu\text{mol} \\
 \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer} \\
 &\quad \text{sitrat pH 5,5} \\
 &= 2038,89 \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\
 &= 20,389 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{20,389 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 4,078 \mu\text{mol/ml}$$

Konsentrasi di kuvet

$$= \frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{4,078 \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,163 \mu\text{mol/ml}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi glukosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 3,255x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi glukosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi.

## A.2 Perhitungan Kurva Standar Xilosa

Massa xilosa	= 0,367 gram
Volume buffer sitrat pH 5,5	= 100 ml
BM xilosa	= 50 gram/mol
Mol xilosa	= massa xilosa/BM xilosa
	= 0,367 gram / 150 gram/mol
	= 0,002 mol
	= 2446,67 $\mu\text{mol}$
Konsentrasi xilosa awal	= mol xilosa/ volume buffer sitrat pH 5,5
	= 2446,67 $\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$
	= 24,467 $\mu\text{mol/ml}$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (xilosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi xilosa awal} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{24,467 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 4,893 \mu\text{mol/ml}$$

Konsentrasi di kuvet

$$= \frac{\text{konsentrasi di tabung reaksi} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{4,893 \mu\text{mol/ml} \times 0,2\text{ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,196 \mu\text{mol/ml}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi xilosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 2,785x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi xilosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi.

### A-3 PERHITUNGAN ENZIM

A.1 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dengan Substrat Jerami Padi Sebelum koreksi koreksi Setelah koreksi konsentrasi jumlah aktivitas enzim

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

Sebelum koreksi	koreksi	Setelah koreksi	konsentrasi	jumlah	aktivitas enzim
A1	A2	A	gula (umol/ml)	umol gula	U/ml
0,119	0,084	0,035	0,114	0,57	0,285
0,718	0,604	0,114	0,317	1,587	0,794

$$\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} = 0,119$$

$$\text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} = 0,084$$

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,035 \end{aligned}$$

Konsentrasi glukosa dalam kuvet

$$= A \times \text{slope kurva standar glukosa}$$

$$= 0,035 \times 3,255$$

$$= 0,114 \mu\text{mol/ml}$$

Mol glukosa dalam kuvet  
 = Konsentrasi glukosa x volume total  
 =  $0,114 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml}$   
 =  $0,570 \mu\text{mol}$

Aktivitas enzim selulase (U/ml)  
 = mol glukosa/waktu inkubasi  
 =  $0,570 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit}$   
 =  $0,057 \text{ U} / \text{volume enzim}$   
 =  $0,057 \text{ U} / 0,2 \text{ ml}$   
 =  $0,285 \text{ U/ml}$

2. Pengukuran aktivitas enzim xilanase
- |   |             |
|---|-------------|
| Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1) | = 0,718     |
| Absorbansi larutan koreksi (A2)         | = 0,604     |
| Absorbansi larutan setelah koreksi (A)  | = $A1 - A2$ |
|   | = 0,114     |

Konsentrasi xilosa dalam kuvet  
 = A x slope kurva standar xilosa  
 =  $0,035 \times 2,785$   
 =  $0,317 \mu\text{mol/ml}$

Mol xilosa dalam kuvet  
 = Konsentrasi xilosa x volume total  
 =  $0,317 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml}$   
 =  $1,587 \mu\text{mol}$

Aktivitas enzim xilanase (U/ml)  
 = mol xilosa/waktu inkubasi  
 =  $1,587 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit}$   
 =  $0,159 \text{ U} / \text{volume enzim}$   
 =  $0,159 \text{ U} / 0,2 \text{ ml}$   
 =  $0,794 \text{ U/ml}$

## A.2 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *A.niger* dengan Substrat Jerami Padi

### 1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\begin{aligned}\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 0,176 \\ \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,067 \\ \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,109\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi glukosa dalam kuvet} \\ &= A \times \text{slope kurva standar glukosa} \\ &= 0,109 \times 3,255 \\ &= 0,356 \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol glukosa dalam kuvet} \\ &= \text{Konsentrasi glukosa} \times \text{volume total} \\ &= 0,356 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml} \\ &= 1,780 \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas enzim selulase (U/ml)} \\ &= \text{mol glukosa} / \text{waktu inkubasi} \\ &= 1,779 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\ &= 0,178 \text{ U} / \text{volume enzim} \\ &= 0,178 \text{ U} / 0,2 \text{ ml} \\ &= 0,890 \text{ U/ml}\end{aligned}$$

### 2. Pengukuran aktivitas enzim xilanase

$$\begin{aligned}\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 0,673 \\ \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,173 \\ \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 = 0,5 \\ \text{Konsentrasi xilosa dalam kuvet} \\ &= A \times \text{slope kurva standar xilosa} \\ &= 0,035 \times 2,785 \\ &= 1,393 \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$



Mol xilosa dalam kuvet  
 = Konsentrasi xilosa x volume total  
 =  $1,393 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml}$   
 =  $6,963 \mu\text{mol}$

Aktivitas enzim xilanase (U/ml)  
 = mol xilosa/waktu inkubasi  
 =  $6,963 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit}$   
 =  $0,696 \text{ U} / \text{volume enzim}$   
 =  $0,696 \text{ U} / 0,2 \text{ ml}$   
 =  $3,481 \text{ U/ml}$

### A.3 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T.reesei* dengan Substrat Dedak Gandum

#### 1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1) = 0,401  
 Absorbansi larutan koreksi (A2) = 0,329  
 Absorbansi larutan setelah koreksi (A) =  $A1 - A2$   
 = 0,072

Konsentrasi glukosa dalam kuvet  
 = A x slope kurva standar glukosa  
 =  $0,072 \times 3,255$   
 =  $0,234 \mu\text{mol/ml}$

Mol glukosa dalam kuvet  
 = Konsentrasi glukosa x volume total  
 =  $0,234 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml}$   
 =  $1,172 \mu\text{mol}$

Aktivitas enzim selulase (U/ml)  
 = mol glukosa/waktu inkubasi  
 =  $1,172 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit}$   
 =  $0,117 \text{ U} / \text{volume enzim}$   
 =  $0,117 \text{ U} / 0,2 \text{ ml}$   
 =  $0,586 \text{ U/ml}$

## 2. Pengukuran aktivitas enzim xilanase

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 1,695 \\
 \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,443 \\
 \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\
 &= 1,252
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Konsentrasi xilosa dalam kuvet} \\
 &= A \times \text{slope kurva standar xilosa} \\
 &= 1,252 \times 2,785 \\
 &= 3,487 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Mol xilosa dalam kuvet} \\
 &= \text{Konsentrasi xilosa} \times \text{volume total} \\
 &= 3,487 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml} \\
 &= 17,434 \mu\text{mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Aktivitas enzim xilanase (U/ml)} \\
 &= \text{mol xilosa} / \text{waktu inkubasi} \\
 &= 17,434 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\
 &= 1,743 \text{ U} / \text{volume enzim} \\
 &= 1,743 \text{ U} / 0,2 \text{ ml} \\
 &= 8,717 \text{ U/ml}
 \end{aligned}$$

A.4 Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase Murni *A.niger*

## Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 0,540 \\
 \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,223 \\
 \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\
 &= 0,317
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Konsentrasi glukosa dalam kuvet} \\
 &= A \times \text{slope kurva standar glukosa} \\
 &= 0,317 \times 3,255 \\
 &= 1,032 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Mol glukosa dalam kuvet} \\
 &= \text{Konsentrasi glukosa} \times \text{volume total} \\
 &= 1,032 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml} \\
 &= 5,159 \mu\text{mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Aktivitas enzim selulase (U/ml)} \\
 &= \text{mol glukosa/waktu inkubasi} \\
 &= 5,159 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\
 &= 0,516 \text{ U} / \text{volume enzim} \\
 &= 0,516 \text{ U} / 0,2 \text{ ml} \\
 &= 2,580 \text{ U/ml}
 \end{aligned}$$

#### A.5 Perhitungan Kebutuhan Enzim Untuk Setiap Variabel

##### 1. Kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* selulase (2T:1A)

$$\begin{aligned}
 &\text{Kebutuhan enzim} = 37,2 \text{ U/2 gr bagasse tebu} \\
 &\text{Kebutuhan } \textit{crude enzyme} \text{ selulase } T. \textit{ reesei} \\
 &= \frac{2/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}} \\
 &= \frac{2/3 \times 37,2 \text{ U}}{0,285 \text{ U/ml}} \\
 &= 87,075 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Kebutuhan *crude enzyme* selulase *A. niger*

$$\begin{aligned}
 &= \frac{2/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}} \\
 &= \frac{2/3 \times 37,2 \text{ U}}{0,890 \text{ U/ml}} \\
 &= 27,873 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Total volume *crude enzyme* selulase 2T:1A = 114,948 ml

##### 2. Kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* xilanase

$$\begin{aligned}
 &\text{Kebutuhan enzim} = 37,2 \text{ U/2 gr bagasse tebu}
 \end{aligned}$$

Kebutuhan *crude enzyme* xilanase *T.reesei*

$$= \frac{2/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{2/3 \times 37,2 \text{ U}}{8,717 \text{ U/ml}}$$

$$= 2,845 \text{ ml}$$

Total volume *crude enzyme* xilanase = 60 ml

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan buffer sitrat pH 3 (37,2U/2gr)} &= 60 \text{ ml} - 2,845 \text{ ml} \\ &= 57,155 \text{ ml} \end{aligned}$$

3. Kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* (2 Selulase (2T:1A) :1 Xilanase)

$$\text{Kebutuhan enzim} = 37,2 \text{ U/2 gr bagasse tebu}$$

Kebutuhan *crude enzyme* selulase *T. reesei*

$$= \frac{2/3 \times 2/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{2/3 \times 2/3 \times 37,2 \text{ U}}{0,285 \text{ U/ml}}$$

$$= 58,050 \text{ ml}$$

Kebutuhan *crude enzyme* selulase *A. niger*

$$= \frac{2/3 \times 1/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{2/3 \times 1/3 \times 37,2 \text{ U}}{0,890 \text{ U/ml}}$$

$$= 9,291 \text{ ml}$$

Kebutuhan *crude enzyme* xilanase *T. reesei*

$$= \frac{1/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{1/3 \times 37,2 \text{ U}}{8,717 \text{ U/ml}}$$

$$= 1,422 \text{ ml}$$

$$\text{Total volume crude enzyme (2 S :1 X)} = 68,763 \text{ ml}$$

## A-4 PERHITUNGAN HIDROLISIS

### A.1 Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi

Massa glukosa = 0,369 gram

Volume buffer sitrat pH 3 = 100 ml

Konsentrasi glukosa awal

= massa glukosa/ volume buffer sitrat pH 3

= 0,369 gram/100 ml

= 0,004 gram/ml

= 3,685 gram/L

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

=  $\frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$

=  $\frac{3,685 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$

= 0,737 gram/L

Konsentrasi di kuvet

=  $\frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$

=  $\frac{0,737 \text{ gram/L} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$

= 0,029 gram/L

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 0,634x$  dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan x sebagai absorbansi.

## A.2 Perhitungan Konsentrasi, Massa, dan Yield Gula Reduksi

### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim selulase (2T:1A) pada jam ke-1

Absorbansi = 0,086

Konsentrasi gula di kuvet

= Absorbansi x slope kurva standar hidrolisis

= 0,086 x 0,634

= 0,055 gram/L

Konsentrasi gula di erlenmeyer

=  $\frac{\text{konsentrasi gula di kuvet} \times \text{volume kuvet}}{\text{volume sampel}}$

=  $\frac{0,055 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}}$

= 1,363 gram/L

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 2. Perhitungan massa gula reduksi

Diambil data hasil konsentrasi gula hidrolisis enzim selulase (2T:1A) pada jam ke-42

Konsentrasi gula di erlenmeyer = 2,393 gram/L

Volume larutan hidrolisis (2T:1A) = 114,947828 ml

Massa gula reduksi = konsentrasi gula x volume larutan

= 2,393 gram/L x (114,948/1000) L

= 0,275 gram

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan yield gula reduksi

Diambil data hasil massa gula hidrolisis jam ke-42 enzim selulase (2T:1A)

Massa gula reduksi = 0,275 gram

Massa bagasse tebu yang dihidrolisis = 2,0044 gram

Yield gula reduksi

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{massa bagasse tebu}} \\
 &= \frac{0,275 \text{ gram}}{(20,775 + 63,595)\% \times 2,0044 \text{ gram}} \\
 &= 0,163 \frac{\text{gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa) bagasse tebu}}
 \end{aligned}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

$$\text{yield} = \frac{\text{konsentrasi gula reduksi} \times \text{volume}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{gram jerami padi}}$$

## BIODATA PENULIS



**Yunus Imam Prasetyo** lahir pada tanggal 06 Agustus 1992 di Kota Surabaya, Jawa Timur. Penulis menempuh pendidikan formal di TK Aisyah Surabaya, melanjutkan di SDN WONOKUSUMO XI Surabaya, kemudian menempuh pendidikan menengah di SMP Negeri 1 Surabaya dan SMA Negeri 1 Surabaya. Dan pada tahun 2010, penulis mulai melanjutkan pendidikan S1 di Institut Teknologi

Sepuluh Nopember (ITS), Fakultas Teknologi Industri, Jurusan Teknik Kimia, sampai dengan terselesaikannya buku ini. Banyak pengalaman yang penulis dapatkan semasa kuliah, diantaranya penulis tergabung sebagai anggota organisasi Lembaga Dakwah Jurusan Teknik Kimia KINI (Kajian Islam Nurul Ilmi) periode 2011/2012.

Penulis menjalani kerja praktek di PT PETROKIMIA Gresik Departemen Produksi III. Dan pada akhir studinya, Laboratorium Teknologi Biokimia Teknik Kimia dipilih untuk pengerjaan tugas akhir. Penulis menyelesaikan tugas Pra-Desain “**Pabrik Bioetanol dari Bagasse Tebu**” dan skripsi yang berjudul “**Produksi Gula Reduksi dari Bagasse Tebu Melalui Hidrolisis Enzimatis Menggunakan *Crude Enzyme* Selulase dan Xilanase**” dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email : [yunus.imam.prasetyo@gmail.com](mailto:yunus.imam.prasetyo@gmail.com)



## BIODATA PENULIS



**Charlin Inova Sitasari** terlahir di Kota Mojokerto, Jawa Timur pada tanggal 21 April 1992. Penulis menempuh pendidikan formal di TK DHARMA WANITA PESANGGRAHAN, melanjutkan di SDN KETIDUR 1 KUTOREJO, kemudian menempuh pendidikan menengah pertama di SMPN 1 MOJOSARI dan menengah atas di SMAN 1 MOJOSARI. Sejak tahun 2010, penulis mulai melanjutkan pendidikan S1 di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Fakultas Teknologi Industri, Jurusan Teknik

Kimia, melakukan penelitian di Laboratorium Teknologi Biokimia sampai dengan terselesaikannya buku ini. Tidak sedikit pengalaman yang penulis dapatkan semasa kuliah, diantaranya penulis tergabung sebagai staff Competency Development Department HIMATEKK ITS periode 2011/2012 dan kembali melanjutkan HIMATEKK ITS Periode 2012/2013 sebagai Seretary Competency Development Department HIMATEKK ITS. Penulis menjalani kerja praktek di Production Engineering HESS (INDONESIA-PANGKAH) LTD GRESIK selama satu bulan (Juli 2013).

Penulis menyelesaikan tugas Pra-Desain “**Pabrik Bioetanol dari Bagasse Tebu**” dan skripsi yang berjudul “**Produksi Gula Reduksi dari Bagasse Tebu melalui Hidrolisis Enzimatis Menggunakan *Crude Enzyme* Selulase dan Xilanase**” di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email: [charlin\\_i@yahoo.com](mailto:charlin_i@yahoo.com)